
**DIE GC-AED-KOPPLUNG ZUR ELEMENTSPEZIFISCHEN BESTIMMUNG
FLÜCHTIGER METABOLITE IN BIOGENESESTUDIEN UND
IN DER AROMAANALYTIK**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin
Manuela Fischer
geboren am 29.09.1971 in Eschwege

2000

Referent : Prof. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. P. Winterhalter

Tag der Promotion: 15.06.2000

Datum der Veröffentlichung: August 2000

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis Mai 2000 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. G. Berger, möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen sowie den Freiraum, den er mir bei der Bearbeitung der Dissertation überließ, herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ferner

allen Kolleginnen und Kollegen am Institut, vor allem meinem Labornachbarn Herrn Dr. Maik Gehrke, sowie Frau Sabine Spaether, Frau Dr. Frauke Neuser und Frau Dr. Elke Latza für das gute und freundschaftliche Verhältnis und viele fröhliche Tage und Abende.

Herrn Dr. Andreas Böker für die Einführung im Umgang mit Basidiomyceten, insbesondere *Nidula niveo-tomentosa*.

Herrn Dr. Ulrich Krings und Herrn Dr. Dietmar Ganßer für anregende Diskussionen zum Thema Massenspektrometrie und Herrn Dr. Jürgen Rolfes für zahlreiche Tipps rund um den AED.

Herrn Dr. Dietmar Breithaupt für die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich Holger, der mir besonders in den letzten Monaten gezeigt hat, was das Leben l(i)ebenswert macht.

Zusammenfassung

Durch die Kopplung von Gaschromatographie und Atomemissionsdetektion steht ein Analysensystem zur selektiven und simultanen Bestimmung verschiedenster Elemente zur Verfügung. Detektionsspezifische Parameter wie Linearität, Nachweisgrenzen und die Unabhängigkeit der Responsefaktoren von der Molekülstruktur wurden untersucht und daraus resultierende Vor- und Nachteile diskutiert. Die Eignung des Analysensystems für Biogenesestudien und Aromaanalytik wurde anhand folgender Beispiele gezeigt.

Die simultane Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Chlor und Brom mittels GC-AED ermöglichte eine selektive Detektion halogener Sekundärmetabolite in Kulturen des Basidiomyceten *Bjerkandera adusta*. Die daran anschließende „compound independent calibration“ lieferte die ungefähren Elementverhältnisse der einzelnen Verbindungen und erleichterte damit die Identifizierung der Verbindungen anhand ihrer massenspektrometrischen Daten. Größere Abweichungen traten dabei vor allem beim Element Sauerstoff auf, dessen Anteil jeweils deutlich zu gering berechnet wurde. Eine Elementaranalyse kann durch eine GC-AED-Messung mit CIC nicht ersetzt werden.

Methylantranilat, ein Benzoessäuremethylester mit orthoständiger Aminofunktion, wird *de novo* durch den Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus* synthetisiert. Im Hinblick auf eine mögliche biotechnologische Gewinnung dieses Aromastoffs wurden Versuche zur Steigerung der Produktbildung durchgeführt. Die Detektion der Zielverbindung in den Kulturextrakten erfolgte dabei durch simultane Messung von Stickstoff und Kohlenstoff mittels GC-AED. Durch *in situ* Adsorption des Methylantranilats an ein hydrophobes Adsorbens konnten erhöhte Produktkonzentrationen erzielt werden, wobei die maximal erreichten Ausbeuten 19 mg L⁻¹ betrugen.

Das als „character impact compound“ des Himbeeraromas bekannte 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on, wird *de novo* durch den Basidiomyceten *Nidula niveotomentosa* gebildet. Um die Effektivität der biotechnologischen Gewinnung zu steigern, wurden verschiedene Biogenesestudien durchgeführt. Dabei wurden die stabilen Isotope ²H/¹H und ¹³C/¹²C mittels GC-AED parallel detektiert. So konnten nach Einsatz von ring-deuteriertem und 2- bzw. 3-¹³C-markiertem L-Phenylalanin als

Precursoren sowie von 1-¹³C-markierter D(+)-Glucose als C-Quelle verschiedene markierte Metabolite identifiziert werden, was entscheidende Hinweise auf den Verlauf der Biogenese lieferte. Anhand von GC-AED-Daten wurden die Einbauraten der Markierungen in die jeweiligen Zielverbindungen berechnet. Hippursäure, die erfolgreich als Precursor zur Himbeerketon-Biosynthese eingesetzt wurde, könnte als effektivere und preisgünstigere Alternative zum L-Phenylalanin für eine biotechnologische Gewinnung dienen. Ihre Precursoraktivität sowie die Hemmung der Biosynthese des Himbeerketons durch Inhibierung der Acetyl-CoA-Carboxylase bestätigten ebenfalls ein von BÖKER postuliertes Biosyntheschema. Die Biosynthese des Himbeerketons in *Nidula niveo-tomentosa* unterscheidet sich damit deutlich von der Biosynthese in der Himbeere.

Mittels GC-AED wurden Aromaextrakte verschiedener Lebensmittel auf die Anwesenheit flüchtiger selenhaltiger Verbindungen hin untersucht. Obwohl Dotierungsversuche mit Dimethyldiselenid in wässriger Matrix Wiederfindungsraten von 98 % ergaben, konnten in den Lebensmittelextrakten keine entsprechenden Verbindungen nachgewiesen werden. Nach Dotierung von Knoblauchhomogenat mit Dimethyldiselenid wurden mehrere selenhaltige Verbindungen detektiert, was die hohe Reaktivität von Selenverbindungen in Lebensmittelmatrixen verdeutlicht. Ein selektiver Nachweis von Selen mittels GC-AED ist prinzipiell auch in Anwesenheit großer Mengen schwefelhaltiger Verbindungen möglich.

Schlagworte: Atomemissionsdetektion, Basidiomyceten, Sekundärmetabolite, Biogenese, Aromastoffe

Summary

Gas chromatography coupled to atomic emission detection provides an analytical system for selective and simultaneous detection of various chemical elements. Detector parameters like linearity, minimum detectable levels, and the dependence of the elemental response on the molecular structure were analysed. Advantages and disadvantages were discussed. The capability of this hyphenated technique for studies on biogenesis and flavour analysis was shown by means of the following examples.

The simultaneous detection of carbon, hydrogen, oxygen, chlorine, and bromine through GC-AED enabled a selective determination of halogenated secondary metabolites of the basidiomycete *Bjerkandera adusta* in liquid culture media. Succeeding “compound independent calibration” provided an approximate elemental composition of the analytes and facilitated their identification on the basis of the mass spectral data. Deviations mainly occurred in the case of the element oxygen, with which always too small parts were determined. Elementary analysis can not be replaced by GC-AED with CIC.

Methyl anthranilate, a benzoic acid methylester with ortho amino function position, is synthesised *de novo* by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. With regard to a possible biotechnological production, attempts were made to improve the productivity of this fungus. The detection of methyl anthranilate in the culture media was carried out by simultaneous measurement of nitrogen and carbon by GC-AED. *In situ* adsorption of methyl anthranilate onto a hydrophobic adsorbent led to higher product yields, with a maximum of 19 mg L⁻¹.

The bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa* is able to synthesise *de novo* 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone), one of the character impact components of raspberry flavor. In order to enhance the biosynthetic efficiency, different studies on the biogenetic pathway were carried out. The stable isotopes ²H/¹H and ¹³C/¹²C were detected simultaneously with GC-AED. After incubation with ring-deuterated or 2- and 3-¹³C-labelled L-phenylalanine as precursors and 1-¹³C-labelled D(+)-glucose as carbon source, respectively, different labelled metabolites could be identified. Based upon these compounds the biogenesis of raspberry ketone in *Nidula niveo-tomentosa* was enlightened. By means of the GC-AED-data the

percentage of incorporation of the label into raspberry ketone and alcohol was calculated. Hippuric acid, which showed precursor activity in the biosynthesis of raspberry ketone, could be used as a more effective and inexpensive alternative to L-phenylalanine in case of a biotechnological production. Her precursor activity as well as the fact, that inhibition of acetyl-CoA-carboxylase suppresses the biosynthesis of raspberry ketone confirmed the biosynthetic scheme postulated by BÖKER. So the difference between the biosynthesis of raspberry ketone in *Nidula niveo-tomentosa* and the plant pathway in raspberry fruits is evident.

Flavour extracts of different foodstuffs were analysed by GC-AED for volatile selenium compounds. Although spiking experiments with dimethyl diselenide in aqueous matrices resulted in recoveries of 98 %, no corresponding compounds were found in extracts from foods. Garlic homogenates were spiked with dimethyl diselenide, and in the extracts several selenium compounds could be detected. This elucidates the high reactivity of such compounds in food matrices. Nevertheless, the selective detection of selenium by GC-AED in presence of high amounts of sulfur compounds is possible on principle.

Key words: atomic emission detection, basidiomycetes, secondary metabolites, biogenesis, flavours

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung und Problemstellung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Problemstellung	4
2 Ergebnisse	6
2.1 Gaschromatographie-Atomemissionsdetektion	6
2.1.1 Linearitätsprüfung, Abhängigkeit der Responsefaktoren einzelner Elemente von der Molekülstruktur	6
2.1.2 Nachweisgrenzen	9
2.1.3 "Compound independent calibration" (CIC)	12
2.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Gewinnung von Methylantranilat	16
2.2.1 Verwendung komplexer Nährmedien	17
2.2.2 Zusatz von Precursoren	19
2.2.3 Variation der C- und N-Quelle und der Konzentration	21
2.2.4 <i>In situ</i> Adsorption mit Lewatit OC 1064	22
2.2.5 Zusammenfassung	23
2.3 Biosynthese und Produktion von Himbeerketon	24
2.3.1 Zusatz von Ring- ² H ₅ -L-Phenylalanin	24
2.3.2 Seitenkettenabbau	26
2.3.2.1 Einsatz von Hippursäure als Precursor	26
2.3.2.2 Zusatz von 2- ¹³ C-L-Phenylalanin	29
2.3.2.3 Zusatz von 3- ¹³ C-L-Phenylalanin	30
2.3.3 Seitenkettenaufbau	34
2.3.3.1 Teilweiser Ersatz der Glucose durch C ₂ - bzw. C ₃ -Bausteine	34
2.3.3.2 Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase	35
2.3.3.3 Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase und gleichzeitiger Zusatz von Dimethylmalonat	37
2.3.3.4 Zusatz von 1- ¹³ C-markierter Glucose	41

2.3.3.5	Weitere Sekundärmetabolite	45
2.3.4	Schlüsselenzyme	49
2.3.4.1	Zusatz intermediärer β -Keto- und β -Hydroxy-carbonsäuren	49
2.3.4.2	Umsetzung von Precursoren mit Enzymrohextrakt	50
2.3.5	Versuche zur Steigerung der Produktivität	50
2.3.5.1	Induktion des Sekundärmetabolismus durch Sauerstoffmangel	50
2.3.5.2	Kultivierung in Leatham-Medium	53
2.4	Aromaextrakte aus Lebensmitteln	53
3	Diskussion	58
3.1	Gaschromatographie-Atomemissionsdetektion	58
3.1.1	Funktionsprinzip	58
3.1.2	Vorteile des AED im Vergleich zu anderen Detektoren	59
3.1.2.1	Simultane Multielement-Bestimmung	59
3.1.2.2	Compound independent calibration	60
3.1.2.3	Bestimmung stabiler Isotope	62
3.1.3	Nachteile des AED im Vergleich zu anderen Detektoren	63
3.2	Aufklärung von Biosynthesewegen mit Hilfe von Precursoren	64
3.3	Biosynthese und Produktion von Methylantranilat	65
3.3.1	L-Tryptophan-Metabolismus	65
3.3.2	<i>de novo</i> Biosynthese von Methylantranilat durch den Basidiomyceten <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	68
3.3.3	Steigerung der Methylantranilatproduktion	69
3.3.3.1	Verbesserung des Wachstums	69
3.3.3.2	Zusatz von Precursoren	70
3.3.3.3	Bedeutung der Laccase	71
3.3.3.4	<i>In situ</i> Adsorption der Zielverbindung	73
3.3.4	Zusammenfassung	74
3.4	Biosynthese und Produktion von Himbeerketon	74
3.4.1	Seitenkettenabbau	78
3.4.1.1	Precursoraktivität von Benzoesäure und Hippursäure	78
3.4.1.2	Metabolisierung von Hippursäure	78
3.4.1.3	Benzoesäure-Metabolismus	79
3.4.1.4	Einsatz von markiertem L-Phenylalanin als Precursor	81
3.4.2	Seitenkettenaufbau	83
3.4.2.1	Zusatz von kurzkettigen „Precursoren“	83

3.4.2.2	Phenylbutanoide Substanzen als Nebenprodukte des Phenylpropanoid-Stoffwechsels	84
3.4.2.3	Das Himbeerketon - ein Polyketid?	85
3.4.2.4	Acetyl-CoA-Carboxylase	86
3.4.2.5	Diclofop-methyl	88
3.4.2.6	Zusatz von markierter D(+)-Glucose	89
3.4.3	Biosynthese des Himbeerketons an einem Multienzym- Komplex	92
3.4.4	Induktion durch Sauerstoff-Mangel	93
3.5	Extraktion flüchtiger Selenverbindungen aus Lebensmitteln	93
3.5.1	Vorkommen und Bedeutung von Selen	94
3.5.2	Biogenese flüchtiger selenhaltiger Verbindungen	95
3.5.3	Analytik flüchtiger selenhaltiger Verbindungen in Lebensmitteln mittels GC-AED	98
3.5.4	Zusammenfassung	101
4	Experimenteller Teil	102
4.1	Materialien	102
4.1.1	Verwendete Basidiomyceten	102
4.1.2	Verwendete Medien	102
4.1.3	Verwendete Chemikalien	106
4.1.4	Lösungsmittel	110
4.1.5	Gase	111
4.1.6	Geräte	111
4.2	Mikrobiologie	113
4.2.1	Stammhaltung, Kulturführung und –kontrolle und Inokulum- Präparation	113
4.2.2	Bestimmung einiger Kulturparameter	114
4.2.3	<i>In situ</i> Adsorption von Methylantranilat aus Kulturen von <i>P. cinnabarinus</i>	115
4.2.4	Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase und gleichzeitiger Zusatz von Precursoren	116
4.2.5	Gewinnung von Enzymrohextrakten	116
4.3	Isolierung flüchtiger Verbindungen	116
4.3.1	Aromaextrakte aus Lebensmitteln	116
4.3.2	Isolierung flüchtiger Verbindungen aus den Kulturmedien	118
4.3.3	Isolierung flüchtiger Verbindungen aus dem Pilzmycel	119
4.4	Analytik	120

4.4.1	Kapillar-Gaschromatographie – Atomemissionsdetektion (GC-AED)	120
4.4.2	Kapillar-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	123
4.4.3	Kapillar-Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS)	124
4.4.4	Berechnung von Kováts-Indices	125
4.5	Derivatisierungen für die GC	125
4.5.1	Methylierung organischer Säuren	125
4.5.2	Veresterung von L-Alanin mit n-Propanol/HCl zur Ermittlung der AED-Nachweisgrenze für ^{13}C	125
4.5.3	Silylierung mit <i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)	126
4.5.4	Acetylierung mit Acetanhydrid/Essigsäure	126
4.6	Synthesen	126
4.6.1	5- ^2H -Vanillin zur Ermittlung der AED-Nachweisgrenze für ^2H	126
4.6.2	4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol	126
4.6.3	Ring- ^2H -L-Phenylalanin	127
4.6.4	3-Hydroxy-3-phenyl-propansäureethylester	127
4.6.5	3-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-propansäure	127
4.6.6	3-Hydroxy-3-(3-methoxyphenyl)-propansäure	128
4.6.7	3-Hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)-propansäure	128
4.7	Entsorgungshinweise	128
4.7.1	Biologisches Material	128
4.7.2	Lösungsmittel und Chemikalien	128
5	Anhang	130
6	Literatur	138

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Aufbau eines Atomemissionsdetektors	2
Abb. 1-2	Methylantranilat als Zielkomponente des biotechnologischen Verfahrens mit <i>P. cinnabarinus</i> als Produktionsorganismus	3
Abb. 1-3	Himbeerketon und Himbeeralkohol als Zielkomponenten des biotechnologischen Verfahrens mit <i>N. niveo-tomentosa</i> als Produktionsorganismus	4
Abb. 2-1	AED-Kalibriergeraden für Stickstoff aus Messungen mit unterschiedlichen stickstoffhaltigen Verbindungen	8
Abb. 2-2	AED-Kalibriergeraden für Sauerstoff aus Messungen mit unterschiedlichen sauerstoffhaltigen Verbindungen	9
Abb. 2-3	GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Kulturen von <i>B. adusta</i>	13
Abb. 2-4	Für die CIC eingesetzte halogenierte Benzaldehydderivate	14
Abb. 2-5	GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Kulturen von <i>P. cinnabarinus</i>	17
Abb. 2-6	Trockenmassen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63 und I-937	18
Abb. 2-7	Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63	18
Abb. 2-8	Trockenmassen am 6. Kulturtag in PCI-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Kynurenin und/oder L-Tryptophan als Precursoren, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63 und I-937	19
Abb. 2-9	Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in PCI-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Kynurenin und/oder L-Tryptophan als Precursoren, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63	20
Abb. 2-10	Trockenmassen und Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an L-Tryptophan, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63	21
Abb. 2-11	Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit von der N-Quelle, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63	22

Abb. 2-12	Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in PCI-Medium, PCI-Medium mit Lewatitzusatz und im Lewatitdesorbat, <i>P. cinnabarinus</i> CBS 353.63	23
Abb. 2-13	GC-AED-Chromatogramme des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von Ring- $^2\text{H}_5$ -L-Phenylalanin	25
Abb. 2-14	4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on als Nebenprodukt der Himbeerketon-Biosynthese nach Zusatz von L-Phenylalanin	25
Abb. 2-15	Hippursäure als Precursor für die Biosynthese von Himbeerketon	26
Abb. 2-16	Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen am 12. Kulturtag in SNL-Hefe- bzw. Sojapepton-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Phenylalanin (3 mM, 0. KT) als Precursor	27
Abb. 2-17	Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen am 12. Kulturtag in SNL-Hefe- bzw. Sojapepton-Medium mit Hippursäure (1 bzw. 10 mM, 0. KT) als Precursor, <i>N. niveo-tomentosa</i> ATCC 38357 und CBS 380.80	28
Abb. 2-18	Zeitlicher Verlauf der Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Phenylalanin oder Hippursäure als Precursor, <i>N. niveo-tomentosa</i> CBS 380.80	28
Abb. 2-19	Mögliche Metabolisierung von 2- ^{13}C -L-Phenylalanin zu Himbeerketon	30
Abb. 2-20	Mögliche Metabolisierung von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin zu Himbeerketon	30
Abb. 2-21	GC-AED-Chromatogramme des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin (3 mM, 0. KT)	31
Abb. 2-22	Massenspektren von Himbeerketon (2a) und Himbeeralkohol (3a) nach Zusatz von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin (3 mM, 0. KT) als Precursor	33
Abb. 2-23	GC-FID-Chromatogramme der Pentan/Diethylether-Extrakte von Kulturen ohne Inhibitor bzw. mit Diclofop-methyl (0,1 bzw. 1 mM, 0. KT) als Inhibitor	36
Abb. 2-24	Wachstumsverlauf der Kulturen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“	38

Abb. 2-25	Zeitlicher Verlauf der Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen in Kulturen ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“	39
Abb. 2-26	Zeitlicher Verlauf der Benzaldehydkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“	39
Abb. 2-27	Zeitlicher Verlauf der Phenylmethanolkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“	40
Abb. 2-28	Zeitlicher Verlauf der Phenylethanolkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“	40
Abb. 2-29	GC-AED-Chromatogramme des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von 1- ¹³ C-D(+)-Glucose	42
Abb. 2-30	Massenspektren von Himbeerketon (2b) und Himbeeralkohol (3b) nach Kultivierung mit 1- ¹³ C-D(+)-Glucose als C-Quelle	44
Abb. 2-31	Massenspektren zweier ¹³ C-markierter Verbindungen (5a) und (6a) nach Kultivierung mit 1- ¹³ C-D(+)-Glucose als C-Quelle	46
Abb. 2-32	McLafferty-Umlagerung unter Abspaltung des Neutralteilchens C ₃ H ₆ O	48
Abb. 2-33	Zingerol als weiterer Sekundärmetabolit in Kulturen von <i>N. niveo-tomentosa</i>	48
Abb. 2-34	Propansäuren als Intermediate bei der Biosynthese von Himbeerketon in <i>N. niveo-tomentosa</i>	49
Abb. 2-35	Himbeerketon- und Himbeeralkoholausbeuten, normiert auf Trockenmasse	51
Abb. 2-36	Hauptmetabolite nach Kultivierung in 300 mL-Erlenmeyerkolben unter Sauerstoffmangelbedingungen	52
Abb. 2-37	Hauptmetabolite nach Kultivierung in 200 mL-Erlenmeyerkolben unter Sauerstoffmangelbedingungen	52
Abb. 2-38	GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Knoblauch	54
Abb. 2-39	GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Knoblauch unter Zusatz von Dimethyldiselenid	55

Abb. 3-1	L-Tryptophan – Anthranilsäure – Metabolismus	67
Abb. 3-2	Phenoxazinone als Kondensationsprodukte aus Anthranilsäure-Derivaten	72
Abb. 3-3	Bis(tartrato)cuprat(II)-Komplex	73
Abb. 3-4	Hypothetisches Biosyntheschema zur Bildung von Himbeerketon im Basidiomyceten <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	75
Abb. 3-5	Vergleich der Biosynthese von Himbeerketon in der Himbeere (<i>Rubus idaeus</i>) und im Basidiomyceten <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	77
Abb. 3-6	Hemmung der am Benzoessäure-Metabolismus beteiligten Enzyme durch Benzoessäure und ihre Metabolite	80
Abb. 3-7	Einsatz von 2- ¹³ C-L-Phenylalanin als Precursor für die Himbeerketon-Biosynthese	81
Abb. 3-8	Übersicht über die identifizierten markierten Metabolite nach Zusatz von 3- ¹³ C-L-Phenylalanin	82
Abb. 3-9	Ausgewählte „Precursoren“ als Vorläufersubstanzen für Malonyl-CoA	83
Abb. 3-10	Natürlich vorkommende pflanzliche und mikrobielle Polyketide	86
Abb. 3-11	Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch ACC	87
Abb. 3-12	2-[4-(2,4-Dichlorphenoxy)-phenoxy]-propansäuremethylester (Diclofop-methyl)	88
Abb. 3-13	Metabolisierung von D(+)-Glucose und Bildung von Malonyl-CoA	90
Abb. 3-14	Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol durch Kondensation von 4-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA und Position der ¹³ C-Markierung in den Zielverbindungen	91
Abb. 3-15	Selen-Analoga S-haltiger Aminosäuren	95
Abb. 3-16	Beispiele für die Bildung S-haltiger Aromastoffe aus Cystein-S-Oxiden	96
Abb. 3-17	Mikrobielle Bildung von Dimethylselenid aus Seleniten mit Dimethylselenon als Intermediat, nach Challenger	98
Abb. 3-18	Mikrobielle Bildung von Dimethylselenid und Folgeprodukten aus Seleniten mit elementarem Selen als Intermediat, nach Doran und Chasteen <i>et al.</i>	98

Abb. 4-1	Oxidierte und reduzierte Form von Methylenblau	115
Abb. 5-1	Massenspektren von Himbeerketon (2) und Himbeeralkohol (3)	130
Abb. 5-2	Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen (5) und (6) in Kulturen von <i>N. niveo-tomentosa</i>	131
Abb. 5-3	Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen in Kulturen von <i>N. niveo-tomentosa</i> nach Derivatisierung mit BSA	132
Abb. 5-4	Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen in Kulturen von <i>N. niveo-tomentosa</i> nach Derivatisierung mit Acetanhydrid/ Essigsäure	133
Abb. 5-5	Massenspektrum von Dimethyldiselenid	134
Abb. 5-6	Massenspektrum von Dimethylselenylsulfid	134
Abb. 5-7	Massenspektrum von Methylselenylallylsulfid	135
Abb. 5-8	Massenspektrum von Dimethylselenyldisulfid	135
Abb. 5-9	Massenspektrum von Methylselenylallyldisulfid	136

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Zur Überprüfung der Resonanzfaktoren im AED ausgewählte Verbindungen mit unterschiedlichen N- bzw. O-haltigen funktionellen Gruppen	7
Tab. 2-2	Kalibrierfunktionen zur Stickstoff- bzw. Sauerstoffbestimmung	8
Tab. 2-3	Nachweisgrenzen des AED für ausgewählte Elemente	11
Tab. 2-4	Identifizierte halogenhaltige Sekundärmetabolite unter Berücksichtigung der CIC-Ergebnisse und der massenspektrometrischen Daten	15
Tab. 2-5	Identifizierte Verbindungen in Kulturen ohne bzw. mit Diclofop-methyl (0,1 bzw. 1mM) als Inhibitor; Extraktion der Kulturmedien bei pH 1,5 und pH 7	37
Tab. 2-6	Selenverbindungen aus Wiederfindungsversuch von Dimethyldiselenid in Knoblauchhomogenat	55
Tab. 3-1	Maximale Methylantranilatkonzentrationen in Abhängigkeit von den L-Tryptophan- und Vitamin B ₆ -Gehalten der N-Quelle	68
Tab. 3-2	Enzyme des Benzoessäure-Metabolismus, von ihnen katalysierte Reaktionen und ihre Inhibitoren	80
Tab. 3-3	Natürlich vorkommende flüchtige Se-haltige Verbindungen	97
Tab. 3-4	Selengehalte ausgewählter Lebensmittel	99
Tab. 4-1	Nährmedienbestandteile	106
Tab. 4-2	Precursoren und sonstige Chemikalien für die Mikrobiologie	108
Tab. 4-3	Chemikalien für Analytik und Synthese	108
Tab. 4-4	Verwendete Lösungsmittel	110
Tab. 4-5	Verwendete Gase	111
Tab. 4-6	Anteile an ¹³ C-markiertem Himbeeralkohol nach Zusatz von 3- ¹³ C-L-Phenylalanin bzw. 1- ¹³ C-D(+)-Glucose zu Kulturen von <i>N. niveo-tomentosa</i>	121

Tab. 4-7	Responsefaktoren für Kohlenstoff, Wasserstoff, Chlor, Brom und Sauerstoff nach Kalibrierung mit 3-Chlorbenzaldehyd und 3-Brom-4-methoxybenzaldehyd	122
Tab. 4-8	Anhand der CIC-Daten berechnete Elementverhältnisse halogenhaltiger Verbindungen in Kulturen von <i>B. adusta</i>	122

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ATCC	American Type Culture Collection
AS	Aminosäure
Atten	Attenuation
bidest.	bidestilliert
BOZ	Benzoxazol
BSA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
chem.rein	chemisch rein
CIC	Compound independent calibration
CoA	Coenzym A (gebunden)
CoASH	Coenzym A (frei)
dest.	destilliert
DMM	Dimethylmalonat
ECD	Elektroneneinfangdetektor
eV	Elektronenvolt
EI	Elektronenstoßionisation
EN	Ethylnicotinat
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
f. Mikrobiol.	für die Mikrobiologie
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC-AED	Gaschromatographie-Atomemissionsdetektion
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HA	Himbeeralkohol
Hip	Hippursäure (N-Benzoylglycin)
HK	Himbeerketon
HK+HA	Summe von Himbeerketon und Himbeeralkohol

HL	Hochschullieferung
ISTD	Interner Standard
KI	Kováts-Index
Kyn	Kynurenin
KT	Kulturtag
Phe	Phenylalanin
MG	Molekulargewicht
M ⁺	Molekülpeak
MA	Methylantranilat
MDL	Minimum detectable level
m/z	Masse- Ladungsverhältnis
NAD(P)	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat): oxidiert
NAD(P)H	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat): reduziert
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
NWG	Nachweisgrenze
p.a.	pro analysi
PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
Prec.	Precursor
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
SNA	Standardnähragar
SNL	Standardnährlösung
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trockenmasse
TMP	Trimethylpyrazin
Trp	Tryptophan
v/v	bei Prozentangaben (Volumen pro Volumen)

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Zur Zeit werden etwa 80 % aller erhältlichen Duft- und Aromastoffe mittels chemischer Synthese hergestellt. In Deutschland sind im Lebensmittelbereich jedoch über 70 % aller eingesetzten Aromastoffe natürlicher Herkunft – Tendenz weiter steigend [1]. Die Konzentrationen, in denen die gefragten Verbindungen in der Natur vorkommen, sind z. T. äußerst gering, was eine Gewinnung aus natürlichen Quellen nicht nur aufwendig und teuer macht, sondern die steigende Nachfrage oftmals auch nicht befriedigen kann.

In lebensmittelrechtlichem Sinne sind natürliche Aromastoffe chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, die u. a. durch mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft gewonnen werden können [2]. Dadurch wird die biotechnologische Stoffproduktion zu einer alternativen Quelle für natürliche Aromastoffe, die gegenüber den konventionellen Rohstoffen vor allem zwei Vorteile bietet: Weitgehende Ressourcenunabhängigkeit sowie spezifische und selektive enzymatische Synthese.

Bei den von Mikroorganismen produzierten Aromastoffen handelt es sich häufig um Sekundärmetabolite, die zwar bereits während der Trophase gebildet werden können, jedoch für den Produzenten offenbar keine direkte Funktion im Stoffwechsel besitzen [3,4,5]. Um die Ausbeuten zu steigern, werden bei der biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen häufig Precursoren eingesetzt. Dabei handelt es sich um metabolische Vor- oder Zwischenstufen, die selbst Substanzen des Sekundärstoffwechsels sind oder aus dem Primärstoffwechsel stammen. Die Aufklärung von Biosynthesewegen macht eine biotechnologische Gewinnung wichtiger Aromastoffe häufig erst möglich, weil sie die entscheidenden Hinweise zur Wahl der am besten geeigneten Precursoren liefert.

Um den Verbleib des Precursors und seinen Einbau in die Sekundärmetaboliten verfolgen zu können, verwendet man markierte Verbindungen. Dafür stehen prinzipiell zwei Methoden zur Wahl: Zum einen radioaktive Markierungen mit ^{14}C

oder ^3H , die sehr empfindlich mit Scintillationszählern gemessen werden können, zum anderen stabilisotopen-markierte Verbindungen (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^2H), die etwas unempfindlicher mittels Massenspektrometrie und/oder NMR-Spektroskopie untersucht werden können [6]. Ein entscheidender Vorteil der Stabilisotopen-Markierung ist jedoch in der wesentlich einfacheren Handhabung der Verbindungen zu sehen.

Die Kopplung der Gaschromatographie mit der Atomemissionsspektroskopie (GC-AED) bietet die Möglichkeit einer schnellen und selektiven Bestimmung stabiler Isotope wie ^2H , ^{13}C und ^{15}N auch in Anwesenheit großer Überschüsse an unmarkierten Verbindungen und ist damit ideal zur Untersuchung von chemischen Reaktionsabläufen sowie katabolen und anabolen Stoffwechselwegen geeignet [7,8,9].

Daneben ist mittels GC-AED die Analytik fast aller Elemente des Periodensystems möglich. Sie kann damit auch zur Untersuchung von Aromastoffen, von denen eine Vielzahl neben Kohlenstoff und Wasserstoff verschiedene Heteroatome wie beispielsweise Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel enthalten, eingesetzt werden [10-14].

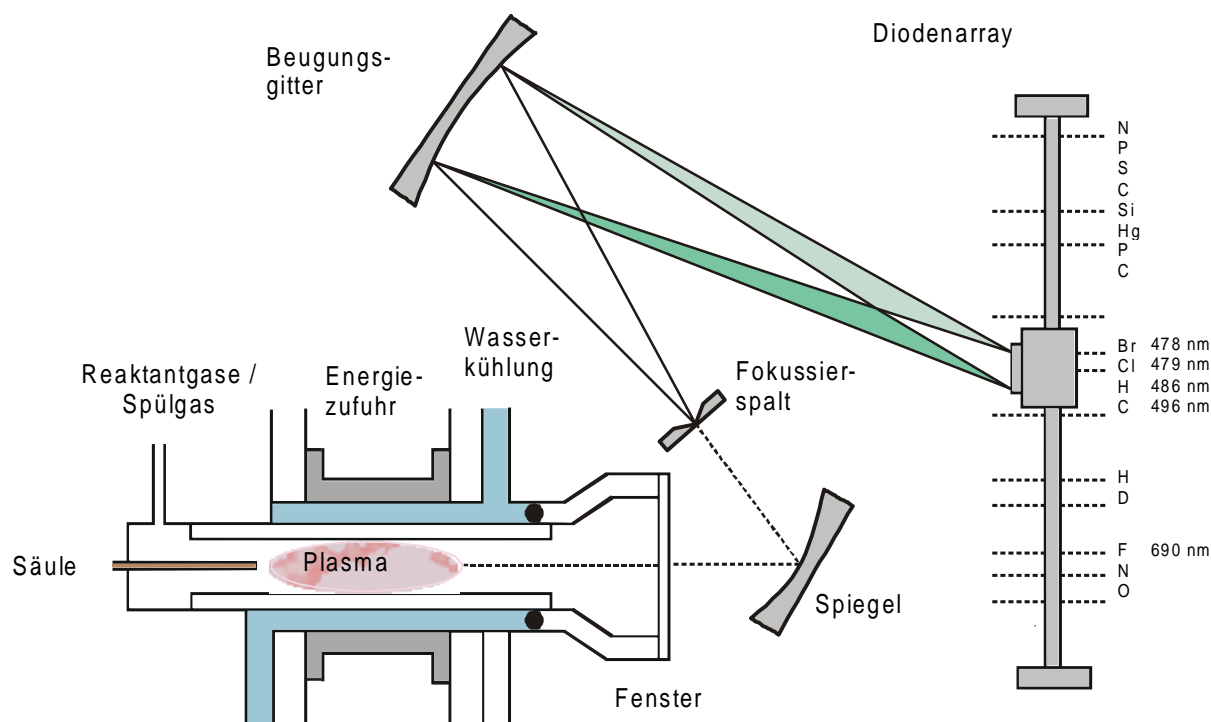
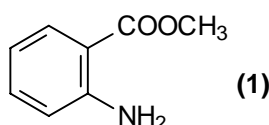


Abb. 1-1: Aufbau eines Atomemissionsdetektors

Biogenesestudien wurden anhand von zwei Beispielen durchgeführt. Methylantranilat (**Abb. 1-2**), ein Benzoessäuremethylesterderivat mit orthoständiger Aminofunktion findet sich als Aromakomponente in vielen Blütenölen (Goldlack, Jasmin, Ylang-Ylang, Neroli, Bergamotte), in Citrusölen (petit grain Mandarinen, Limone, Orange) sowie im Saft der Concordtraube (*Vitis labrusca*) und ist zudem für den fruchtigen Geruch von *Cortinarius odoratus* und *Inocybe pyriodora* verantwortlich [15]. Der Ester wird häufig in Lebensmittelaromen und für Parfums verwendet, wofür jedes Jahr ca. 27 t benötigt werden [16].



Methylantranilat
2-Amino-benzoessäuremethylester
CAS: 134-20-3
MG: 151; C₈H₉NO₂

Abb. 1-2: Methylantranilat als Zielkomponente des biotechnologischen Verfahrens mit *P. cinnabarinus* als Produktionsorganismus

Der Gewinnung aus den genannten natürlichen Quellen stehen im wesentlichen zwei alternative Verfahren gegenüber: Zum einen die Demethylierung von N-Methylantranilat aus petit grain-Mandarinenöl durch *Trametes* und/oder *Polyporus*-Arten [17]. Dieses Verfahren ist teuer, liefert nur geringe Ausbeuten und zudem als unerwünschtes Nebenprodukt N-Formyl-methylantranilat. Zum anderen die Methylierung von Anthranilsäure aus Säurehydrolysaten von Caseinen und Peptonen mit mikrobiellen Enzymen (*P. cinnabarinus*), die jedoch zu einem, im lebensmittelrechtlichen Sinne, nicht natürlichen Produkt [16] führt. Von Seiten der Essenzenindustrie besteht daher Interesse an einer biotechnologischen Produktion von natürlichem Methylantranilat. Mit den Basidiomycetenspezies *Poria cocos* [18, 19] und *Pycnoporus cinnabarinus* [20] existieren neben den bereits erwähnten *Cortinarius odoratus* und *Inocybe pyriodora* noch mindestens zwei Organismen, die zur *de novo* Synthese von Methylantranilat befähigt sind.

Als zweites Beispiel wurde „Himbeerketon“, eine phenylbutanoide Verbindung mit zwei sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen (**Abb. 1-3**), ausgewählt. 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on ist als "character-impact compound" des Himbeeraromas bekannt [15], kommt z. T. als Glucosid aber auch in anderen Pflanzen wie beispielsweise Rhabarber (*Rheum palmatum*) [21] oder Pfirsich (*Prunus persica*) [22] sowie in Drüsensekreten von Biber (*Castor canadensis*) [23] und Melonenfliege (*Dacus cucurbitae*) [24] vor. Bereits 1980 wurde es von AYER und SINGER [25] auch in Oberflächenkulturen des Weißfäulepilzes *Nidula niveo-tomentosa* nachgewiesen.

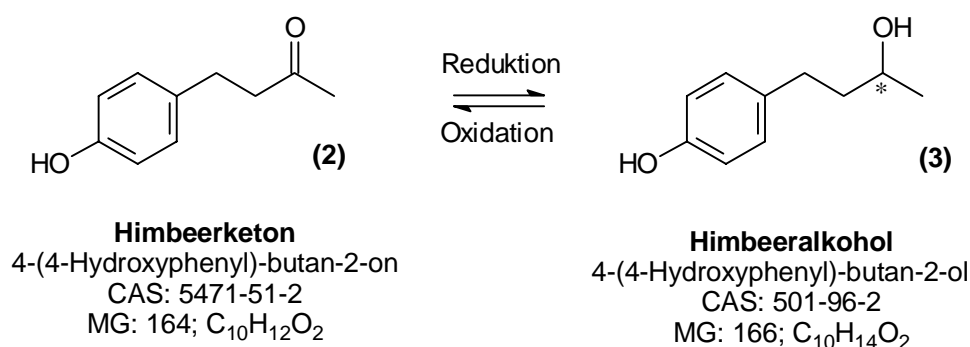


Abb. 1-3: Himbeerketon und Himbeeralkohol als Zielkomponenten des biotechnologischen Verfahrens mit *N. niveo-tomentosa* als Produktionsorganismus

Die biotechnologische Gewinnung von Himbeerketon mit *Nidula niveo-tomentosa* ist prinzipiell möglich; eingehende Untersuchungen hierzu stammen von BÖKER [26].

1.2 Problemstellung

Untersuchungen von BÖKER [26] gaben Hinweise darauf, dass sich die Biosynthese von Himbeerketon im Pilz *Nidula niveo-tomentosa* deutlich von derjenigen in der Himbeere unterscheidet. Im Hinblick auf die Optimierung der biotechnologischen Gewinnung dieses Aromastoffes sollten weitere Erkenntnisse über den von BÖKER [26] postulierten Biosyntheseweg gewonnen und dazu u. a. stabilisotopenmarkierte Precursoren eingesetzt werden. Deren Metabolisierung sollte mittels GC-AED verfolgt werden.

Das Potenzial des Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus* zur Bildung von Methylantranilat sollte näher charakterisiert und Erkenntnisse über die Biosynthese der Zielverbindung gewonnen werden.

Daneben sollte die Anwendbarkeit der GC-AED-Kopplung für die Identifizierung heteroatomhaltiger Sekundärmetabolite in Kulturmedien und flüchtiger Verbindungen in Lebensmitteln gezeigt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Gaschromatographie-Atomemissionsdetektion

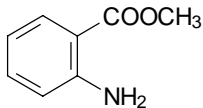
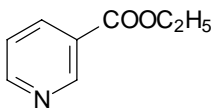
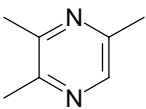
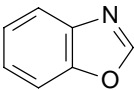
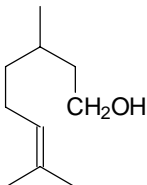
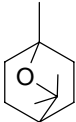
2.1.1 Linearitätsprüfung, Abhängigkeit der Responsefaktoren einzelner Elemente von der Molekülstruktur

Das Prinzip der Atomemissionsdetektion beruht auf einer vollständigen Atomisierung der Analyten in einem Helium-Plasma und der Quantifizierung des von den angeregten Atomen emittierten Lichts. Dabei sollte der Responsefaktor für ein Element jeweils unabhängig von der Struktur der Verbindung und der Bindungsform des Elements sein. Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass eine vollständige Atomisierung nicht immer gewährleistet ist. So wurden beim Vorgängermodell des hier verwendeten Atomemissionsdetektors (HP 5921A) für bestimmte Elemente (Kohlenstoff, Sauerstoff, Chlor, Brom) Abweichungen im Response in Abhängigkeit von der Molekülstruktur beobachtet [27,28,29].

Exemplarisch wurde für Sauerstoff und Stickstoff überprüft, ob derartige Abweichungen auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten AED auftreten.

Als stickstoffhaltige Verbindungen wurden aus dem Bereich der Aromastoffe ein aromatisches Amin und drei Heterocyklen mit einem oder zwei Stickstoff-Atomen bzw. je einem Stickstoff- und einem Sauerstoff-Atom, bei den sauerstoffhaltigen Verbindungen ein Alkohol und ein zyklischer Ether (**Tab. 2-1**), ausgewählt.

Tab. 2-1: Zur Überprüfung der Responsefaktoren im AED ausgewählte Verbindungen mit unterschiedlichen N- bzw. O-haltigen funktionellen Gruppen

Name	Strukturformel	Funktionalität des Stickstoffs bzw. Sauerstoffs
Methylantranilat (MA)		Aromatisches Amin
Ethynicotinat (EN)		Pyridin
Trimethylpyrazin (TMP)		Pyrazin
Benzoxazol (BOZ)		Oxazol
(-)-β-Citronellol		Alkohol
1,8-Cineol		Zyklischer Ether

Die für die einzelnen Verbindungen ermittelten Kalibrierfunktionen im Bereich zwischen 1 und 100 ng (Stickstoff) bzw. 1 und 220 ng (Sauerstoff) sind nachfolgend zusammengefasst.

Tab. 2-2: Kalibrierfunktionen zur Stickstoff bzw. Sauerstoffbestimmung

Verbindung	Regressionsgeradengleichung	Bestimmtheitsmaß r^2
MA	$y = 40,538 x - 5,5537$	1,0000
EN	$y = 42,103 x - 19,837$	0,9998
TMP	$y = 43,214 x + 38,775$	0,9991
BOZ	$y = 44,312 x + 37,352$	0,9972
(-)- β -Citronellol	$y = 5,4999 x + 46,583$	0,9991
1,8-Cineol	$y = 3,7372 x + 79,200$	0,9847

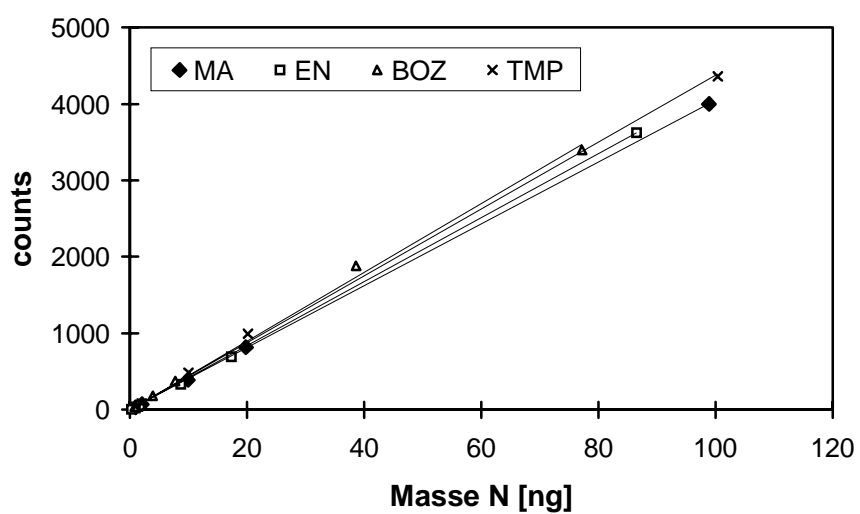


Abb. 2-1: AED-Kalibriergeraden für Stickstoff aus Messungen mit unterschiedlichen stickstoffhaltigen Verbindungen

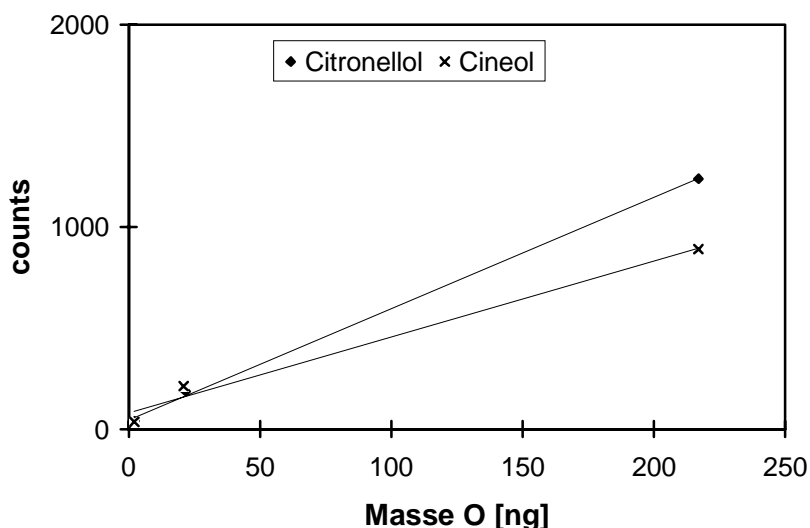


Abb. 2-2: AED-Kalibriergeraden für Sauerstoff aus Messungen mit unterschiedlichen sauerstoffhaltigen Verbindungen

2.1.2 Nachweisgrenzen

Für ausgewählte Elemente wurden jeweils mit Standardsubstanzen die Nachweisgrenzen als „kleinste noch nachweisbare Menge“ gemäß der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$NWG = \frac{3 \cdot h_R \cdot m_P}{h_P \cdot b} \text{ [pg s}^{-1}\text{]}$$

h_R = Höhe des Grundlinienrauschens in cm

h_P = Peakhöhe in cm

m_P = Masse absolut in pg

b = Peakbreite (Basis) in s

Die ermittelten Nachweisgrenzen sind in **Tabelle 2-3** den vom Hersteller angegebenen Werten (teilweise Schätzwerte) vergleichend gegenübergestellt.

Elemente, die simultan bestimmt werden können, sind in Gruppen zusammengefasst. Dabei ist für jedes Element bei einer bestimmten Wellenlänge

unabhängig von den Einstellungen jeweils nur eine Nachweisgrenze angegeben. Diese soll beispielsweise für Kohlenstoff-Messungen (193,009 nm) $0,5 \text{ pg s}^{-1}$ betragen, unabhängig davon, ob als Reaktantgas Sauerstoff oder ein Gemisch aus Sauerstoff und Wasserstoff eingesetzt wird. Die Messbedingungen für die einzelnen Gruppen stellen jedoch meist Kompromisse dar, um die verschiedenen Elemente simultan erfassen zu können. Hieraus können deutliche Unterschiede in den Nachweisgrenzen resultieren.

Die z. T. starken Abweichungen von den vom Hersteller angegebenen Werten lassen sich auch dadurch erklären, dass der AED vornehmlich zum Screening eingesetzt werden sollte, weshalb die Einstellungen möglichst allgemein gewählt und nicht für jedes einzelne Element optimiert wurden.

Tab. 2-3: Nachweisgrenzen des AED für ausgewählte Elemente

Element	Wellenlänge [nm] ¹	Reaktantgase	MDL ² [pg s ⁻¹]	NWG [pg s ⁻¹]
Kohlenstoff	193,009	O ₂ und H ₂	0,5	4
Iod	183,100		10	
Schwefel	180,563		1	
Kohlenstoff	179,297		10	
Stickstoff	174,311		7	
Kohlenstoff	495,518	O ₂	20	1,5
Wasserstoff	485,856		2	
Chlor	479,415		15	
Brom	478,176		20	
Sauerstoff	171,322 ³	H ₂ und CH ₄ /N ₂ (10/90, v/v)	50	400
Stickstoff	387,832 ⁴		20	
Fluor	690,186	H ₂	20	22
Iod	206,271	O ₂ und H ₂	-	
Chlor	837,750	O ₂	15	
Kohlenstoff	833,442		50	
Brom	827,213		20	
Selen	196,036	H ₂ ^e	4	0,3
Kohlenstoff	193,009		0,5	
Arsen	188,994		3,0	
Phosphor	185,907		1,0	
Schwefel	180,563		1,0	
Phosphor	178,687		1,0	
¹² C	177,491 ^c	O ₂ und H ₂	10	67,5
¹³ C	176,934 ^c		10	
¹ H	656,192	O ₂ ^e	0,5	10
² H	655,990		1	
¹⁴ N	419,607 ^d	O ₂ , H ₂ und CH ₄	10	
¹⁵ N	420,872 ^d		3,5	

¹ Nominale Messwellenlängen aus den „Rezepten“ der AED Software.² „Minimum detectable level“ laut Herstellerangaben.³ Nutzt CO-Molekülbande statt Atomemissionslinie.⁴ Nutzt CN-Molekülbande statt Atomemissionslinie.⁵ Mit zusätzlichem Helium Make-up-Fluss.

2.1.3 "Compound independent calibration (CIC)"

Neben der Quantifizierung bekannter Analyte bietet die Atomemissionsdetektion die Möglichkeit, die Elementarzusammensetzung unbekannter Verbindungen anhand der CIC näherungsweise zu ermitteln. Die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens wurde zur Strukturaufklärung halogenierter Sekundärmetabolite aus Kulturen von *Bjerkandera adusta* eingesetzt.

In der Umwelt finden sich zahlreiche Organohalogenverbindungen. Diese können von Mikroorganismen nicht nur metabolisiert werden, sondern werden teilweise auch von ihnen *de novo* synthetisiert. Insbesondere bei den holzabbauenden Basidiomyceten ist diese Fähigkeit weit verbreitet [30]. Zu dieser Gruppe zählt der Weißfäulepilz *Bjerkandera adusta*, der durch die Bildung großer Mengen halogener Aromaten auffiel [31,32].

Nach Submerskultivierung in Standardnährmedien, z. T. mit L-Phenylalanin oder L-Tyrosin als Precursor [31], wurden in den Extrakten mit Hilfe der GC-AED-Analytik mehrere halogenierte Anisyl-derivate detektiert (**Abb. 2-3**).

Die element-spezifischen Chromatogramme geben direkten Aufschluss darüber, ob und gegebenenfalls welche Halogene - auch nebeneinander - vorhanden sind. Unter Berücksichtigung der Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffspuren konnten durch die "compound independent calibration" (CIC) die zugehörigen Summenformeln näherungsweise ermittelt werden. Die Identifizierung mittels GC-MS wurde dadurch wesentlich vereinfacht.

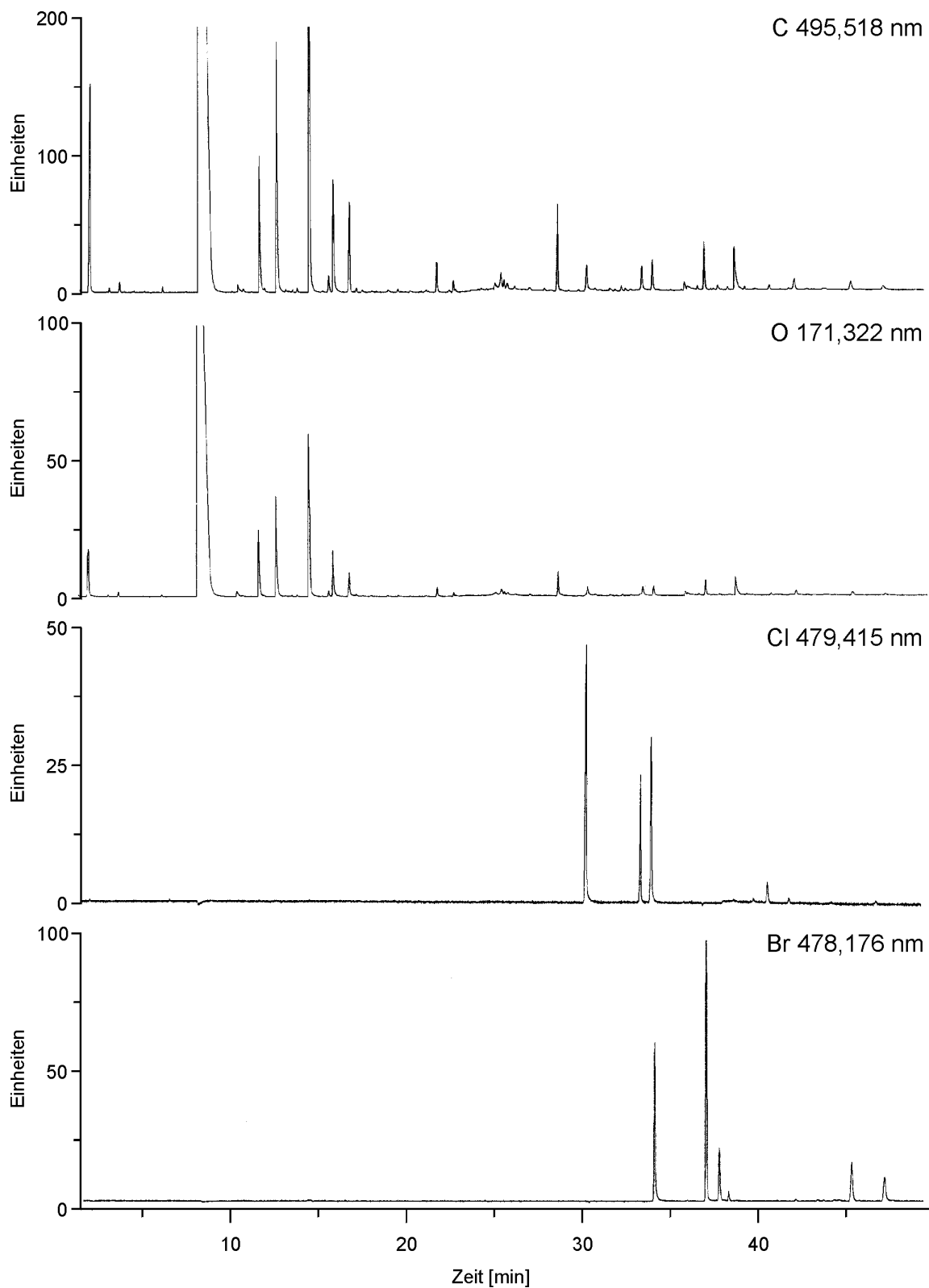


Abb. 2-3: GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Kulturen von *B. adusta*, C-Spur (495,518 nm), O-Spur (171,322 nm), Cl-Spur (479,415 nm), Br-Spur (478,176 nm)

Zur Kalibrierung fanden folgende Substanzen Verwendung:

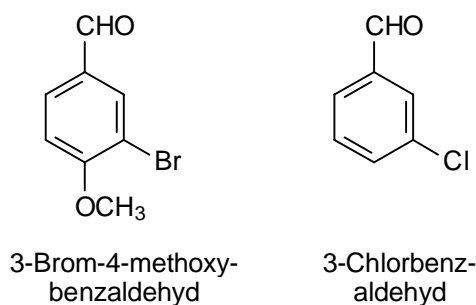


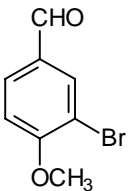
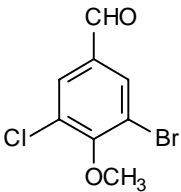
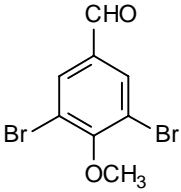
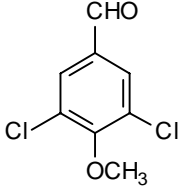
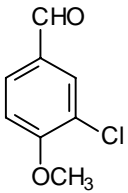
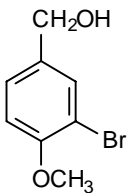
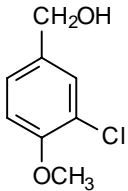
Abb. 2-4: Für die CIC eingesetzte halogenierte Benzaldehydderivate

Die Ergebnisse der Kalibrierung in Form von Responsefaktoren sind im Experimentellen Teil wiedergegeben (**Tab. 4-7**). Durch Anwendung der CIC auf die Extrakte der Submerskulturen wurden die Elementverhältnisse der detektierten Verbindungen berechnet (**Tab. 4-8**). Unter gleichzeitiger Berücksichtigung der massen-spektrometrischen Daten wurden folgende Verbindungen identifiziert (**Tab. 2-4**):

3,5-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd, 3-Chlor-4-methoxybenzaldehyd, 3-Chlor-4-methoxybenzylalkohol, 3-Brom-4-methoxybenzaldehyd, 3-Brom-5-chlor-4-methoxybenzaldehyd, 3-Brom-4-methoxybenzylalkohol, 3,5-Dibrom-4-methoxybenzaldehyd.

Die Abweichungen der berechneten Elementverhältnisse von den Summenformeln lagen für Wasserstoff bei 8-18 % (Ausnahme: 3,5-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd), für Chlor und Brom bei 20-45 % (Ausnahme: 3-Brom-4-methoxybenzylalkohol). Die Abweichungen für die Sauerstoffanteile waren hingegen durchweg größer. Statt zwei Atomen wurden zu kleine Werte zwischen 0,3 und 1 bestimmt, was im Fall des 3,5-Dibrom-4-methoxybenzaldehyds einer Abweichung von 85 % entsprach.

Tab. 2-4: Identifizierte halogenhaltige Sekundärmetabolite unter Berücksichtigung der CIC-Ergebnisse und der massenspektrometrischen Daten

	Name	Summenformel	Summenformel, ber. (CIC)
	3-Brom-4-methoxybenzaldehyd	$C_8H_7BrO_2$	$C_8H_{7.6}Br_{0.8}O$
	3-Brom-5-chlor-4-methoxybenzaldehyd	$C_8H_6BrClO_2$	$C_8H_{6.7}BrCl_{0.8}O$
	3,5-Dibrom-4-methoxybenzaldehyd	$C_8H_6Br_2O_2$	$C_8H_{6.9}Br_{1.1}O_{0.3}$
	3,5-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd	$C_8H_6Cl_2O_2$	$C_8H_{8.5}Cl_{1.4}O$
	3-Chlor-4-methoxybenzaldehyd	$C_8H_7ClO_2$	$C_8H_{8.3}Cl_{0.6}O_{0.5}$
	3-Brom-4-methoxybenzylalkohol	$C_8H_9BrO_2$	$C_8H_{9.8}Br_{0.2}O_{0.4}$
	3-Chlor-4-methoxybenzylalkohol	$C_8H_9ClO_2$	$C_8H_{10}Cl_{0.7}O$

2.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Gewinnung von Methylantranilat

Die Bildung von Methylantranilat in Submerskulturen des Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus* (Karst.) wurde von GROSS *et al.* [20] in folgendem Kulturmedium (PCI-Medium) beobachtet: Maltose (10 g L^{-1}), Diammoniumtartrat ($0,182 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($1,32 \text{ mg L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), Hefeextrakt ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) und Thiamin ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 120 U min^{-1} . Bei Verwendung von frischen Sporen als Inokulum konnten GROSS *et al.* Konzentrationen von bis zu $18,7 \text{ mg L}^{-1}$ erreichen. Für eine wirtschaftliche industrielle Gewinnung ist dies jedoch bei weitem nicht ausreichend.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Stämme CBS 353.63 und I-937 (4.1.1) eingesetzt. Zur Steigerung der Produktausbeuten wurden die C- und N-Gehalte des Mediums variiert, Precursoren (L-Kynurenin, L-Tryptophan) und zur *in situ* Adsorption Lewatit OC 1064 zugegeben. Die Untersuchung der Extrakte mittels GC-AED ermöglichte dabei eine schnelle Identifizierung des stickstoffhaltigen Methylantranilats (**Abb. 2-5**).

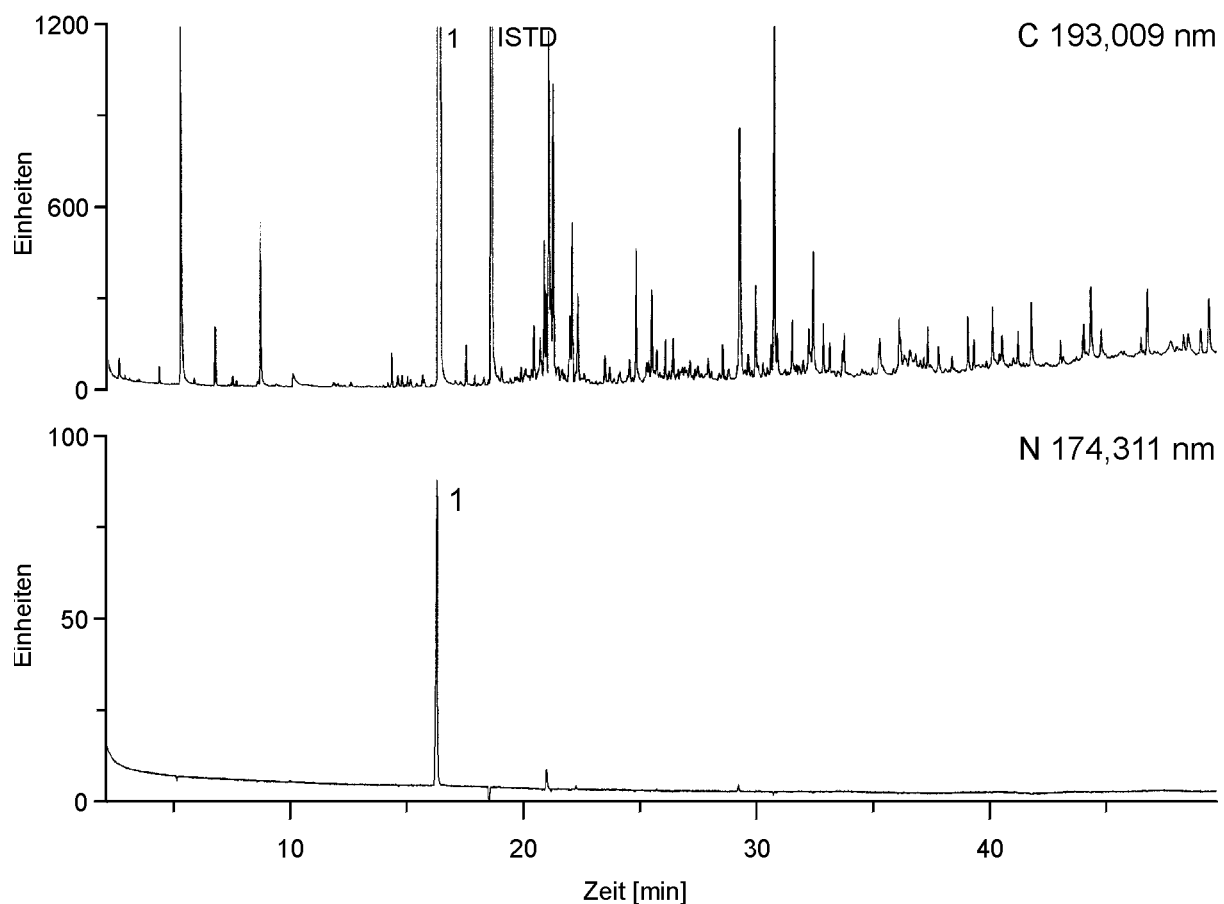


Abb. 2-5: GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Kulturen von *P. cinnabarinus*, C-Spur (193,009 nm), N-Spur (174,311 nm), 1 = Methylantranilat

2.2.1 Verwendung komplexer Nährmedien

In PCI-Medium zeigten die Kulturen von *Pycnoporus cinnabarinus* ein sehr langsames Wachstum. Zum Vergleich wurden die beiden verwendeten Stämme in SNL-Hefe- und Sojapepton-Medium kultiviert, die sich bei anderen Basidiomyceten als sehr gut geeignet erwiesen hatten [26,31].

Bis zum 6. Kulturtag wurden Trockenmassen von 1,9 bis 9,2 g L⁻¹ erreicht (**Abb. 2-6**). Dabei zeigten die Kulturen in SNL-Hefe- und Sojapepton-Medium ein deutlich besseres Wachstum als in PCI-Medium. Zwischen den beiden untersuchten Stämmen I-937 und CBS 353.63 ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede.

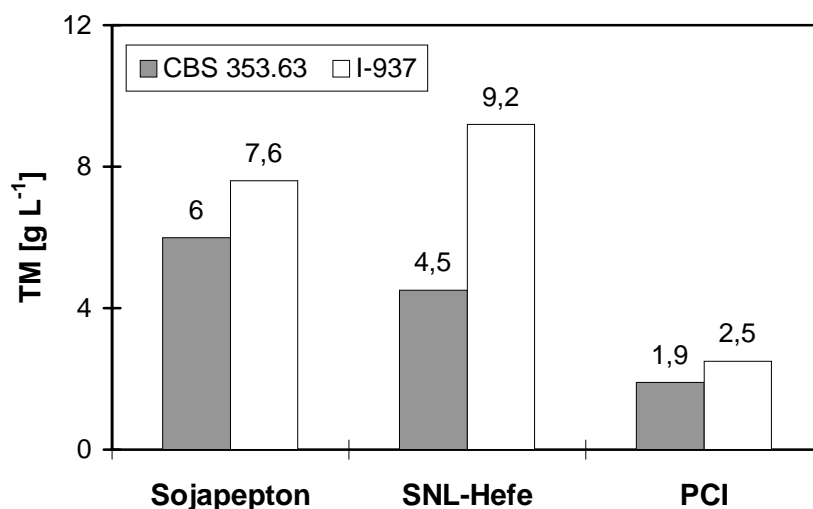


Abb. 2-6: Trockenmassen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium, *P. cinnabarinus* CBS 353.63 und I-937

Methylantranilat wurde ausschließlich in den Kulturen des Stammes CBS 353.63 nachgewiesen (**Abb. 2-7**). Dabei waren die Konzentrationen in Sojapepton- und SNL-Hefe-Medium wesentlich geringer als in PCI-Medium. Wachstum und Produktbildung scheinen demnach nicht zu korrelieren.

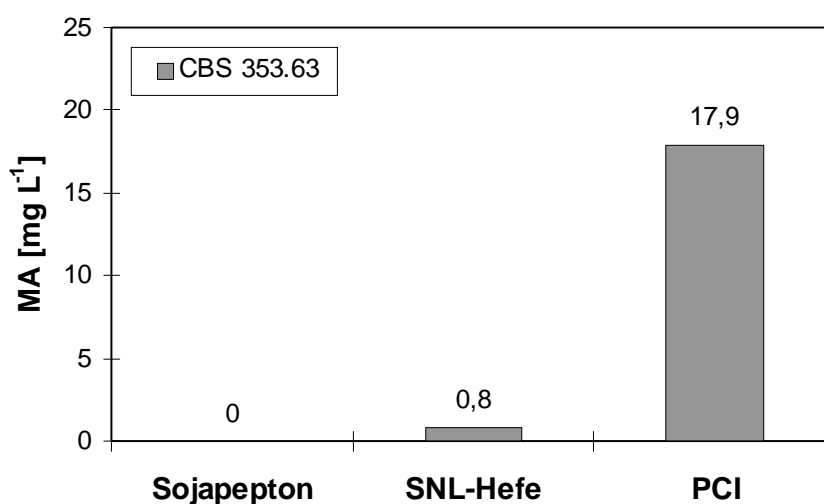


Abb. 2-7: Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium, *P. cinnabarinus* CBS 353.63

2.2.2 Zusatz von Precursoren

Da der L-Tryptophan – Anthranilsäure – Metabolismus (**Abb. 3-1**) bezogen auf L-Tryptophan sowohl katabol als auch anabol verläuft, ist eine Precursorwirkung des L-Tryptophans für die Produktion von Methylantranilat denkbar. Das intermediär gebildete L-Kynurenin kann nicht nur als Precursor dienen, sondern wirkt zudem auf die Enzyme L-Tryptophan-2,3-dioxygenase, Arylformidase und L-Kynureninhydrolase induzierend [33,34].

Im folgenden Versuch wurden die Precursorwirkung des L-Tryptophans und die induzierende Wirkung des L-Kynurenins untersucht. Die mit den beiden Stämmen erzielten Ergebnisse sind in den **Abbildungen 2-8** und **2-9** dargestellt.

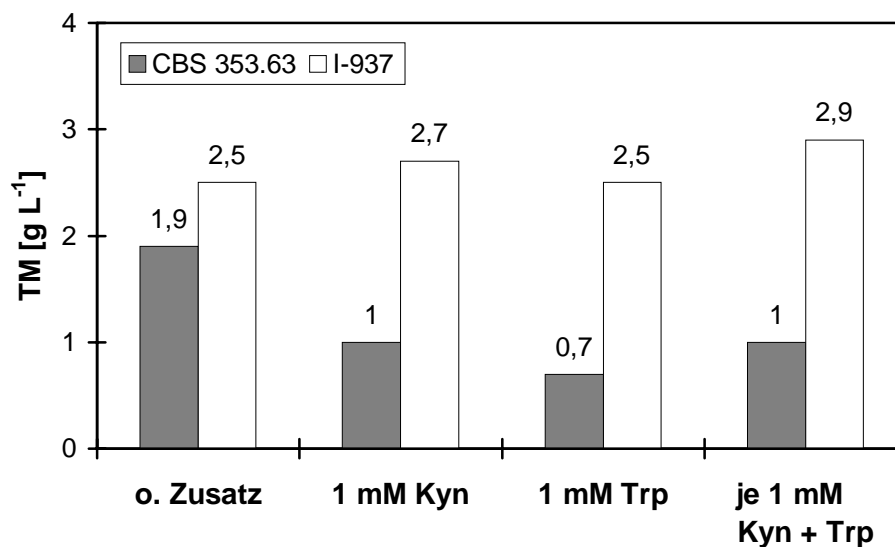


Abb. 2-8: Trockenmassen am 6. Kulturtag in PCI-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Kynurenin und/oder L-Tryptophan als Precursoren,
P. cinnabarinus CBS 353.63 und I-937

Mit allen Kulturen des Stammes CBS 353.63 wurden vergleichbare Trockenmassen im Bereich von 0,7 bis 1,9 g L⁻¹ erzielt. Die mit dem Stamm *P. cinnabarinus* I-937 inokulierten Kulturen zeigten ein deutlich besseres Wachstum (Faktor 2-3); hier wurden Trockenmassen von 2,5 bis 2,9 g L⁻¹ erreicht.

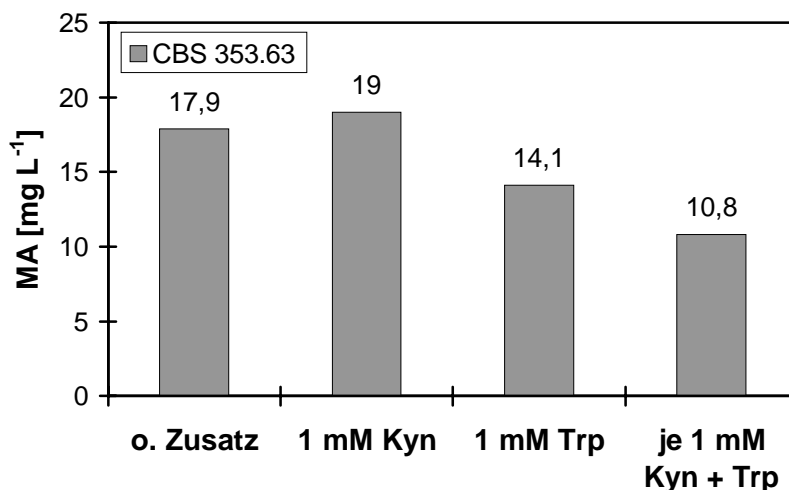


Abb. 2-9: Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtage in PCI-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Kynurenin und/oder L-Tryptophan als Precursoren, *P. cinnabarinus* CBS 353.63

Die Methylantranilatkonzentrationen in den Kulturen von *P. cinnabarinus* CBS 353.63 mit L-Kynurenin-Zusatz waren gegenüber den Kulturen ohne Zusatz leicht erhöht (**Abb. 2-9**). Der Zusatz von L-Tryptophan, auch zusammen mit L-Kynurenin resultierte dagegen in geringeren Methylantranilatkonzentrationen. In den Kulturen von *P. cinnabarinus* I-937 war die Bildung von Methylantranilat auch durch Zusatz von Precursoren nicht induzierbar.

Die Produktinduktion des L-Tryptophanabbaus durch L-Kynurenin ist als Schutzmechanismus der Zelle anzusehen, der die Induktion der katabolen Enzyme durch endogen synthetisiertes und zur Proteinbiosynthese benötigtes L-Tryptophan verhindert. Ein Abbau des L-Tryptophans erfolgt nur, wenn es der Nährlösung zugesetzt worden ist und in hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegt [33]. Die L-Tryptophankonzentration wurde daher um den Faktor 10 erhöht, was in einer nochmaligen deutlichen Abnahme der Ausbeute an Methylantranilat resultierte (**Abb. 2-10**).

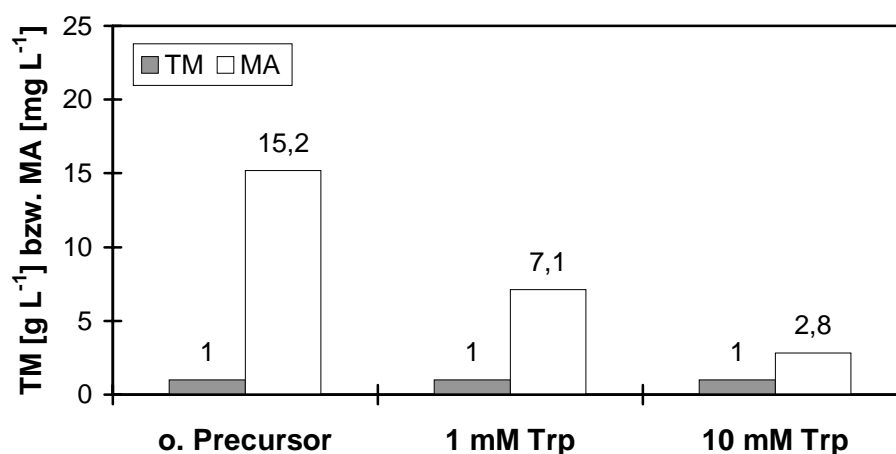


Abb. 2-10: Trockenmassen und Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an L-Tryptophan, *P. cinnabarinus* CBS 353.63

2.2.3 Variation der C- und N-Quelle und der Konzentration

Die Erhöhung der C-Konzentration (von 10 auf 20 g L⁻¹ Maltose) bzw. der N-Konzentration (von 0,182 auf 1,82 g L⁻¹ Diammoniumtartrat) zeigte keine Effekte auf die Produktausbeuten.

Die höchsten Methylantranilatkonzentrationen wurden in Kulturen mit intensiver Orangefärbung und rotem amorphen Niederschlag nachgewiesen [20]. Diese Färbung wird durch Phenoxazinone (**Abb. 3-2**) hervorgerufen, die vermutlich unter katalytischer Wirkung einer Laccase aus Anthranilsäurederivaten gebildet werden [35,36]. Eine intensive Phenoxazinonbildung als Folge einer hohen Laccaseaktivität könnte also auf eine insgesamt erhöhte Stoffwechselaktivität und damit erhöhte Methylantranilatproduktion hindeuten. Da Laccasen Kupfer-Ionen benötigen, die durch Diammoniumtartrat möglicherweise komplexiert werden, wurde als N-Quelle alternativ Ammoniumchlorid eingesetzt. Die in Spuren im Medium enthaltenen Kupfer-Ionen sollten so für die Laccase verfügbar bleiben und die gesteigerte Laccaseaktivität zu einer höheren Methylantranilatausbeute führen.

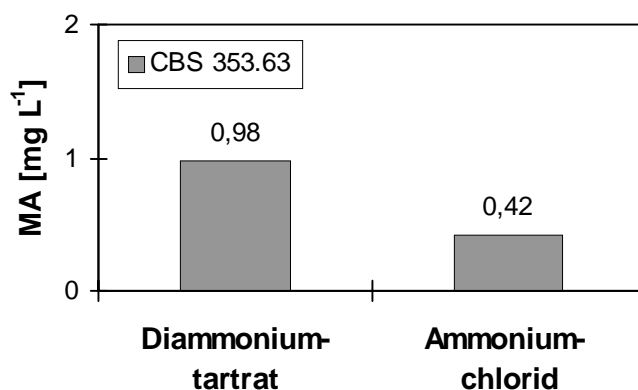


Abb. 2-11: Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in Abhängigkeit von der N-Quelle, *P. cinnabarinus* CBS 353.63

Durch Austausch der N-Quelle, konnte die Methylantranilatkonzentration nicht gesteigert werden (**Abb. 2-11**). Ersatz des Diammoniumtartrats durch Ammoniumchlorid resultierte in einer deutlich geringeren Methylantranilatausbeute.

2.2.4 *In situ* Adsorption mit Lewatit OC 1064

Vom Pilz in das Medium abgegebenes Methylantranilat bzw. verwandte Anthranilsäurederivate können unmittelbar zu Phenoxazinonen oxidiert werden, was zu einer Verringerung der Produktkonzentration führt. Das gebildete Methylantranilat sollte *in situ* adsorbiert und so einer Oxidation entzogen werden. Dem Medium wurde daher das hydrophobe Adsorbens Lewatit OC 1064 zugegeben. Über den Einsatz verschiedener Adsorbentien zur Gewinnung von Aromastoffen aus Kulturmedien wurde bereits berichtet [37,38,39].

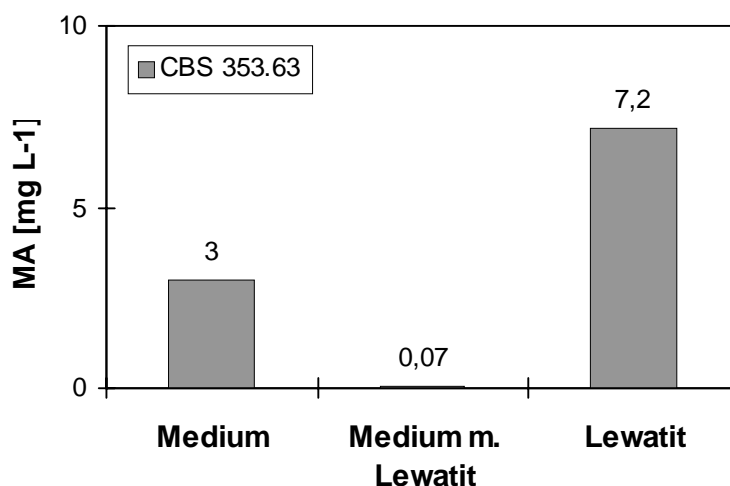


Abb. 2-12: Methylantranilatkonzentrationen am 6. Kulturtag in PCI-Medium, PCI-Medium mit Lewatitzusatz und im Lewatitdesorbat (umgerechnet auf Konzentration im Nährmedium), *P. cinnabarinus* CBS 353.63

Durch Zugabe von Lewatit OC 1064 wurde das gebildete Methylantranilat zu etwa 99 % *in situ* adsorbiert. Die maximal erzielbare Konzentration konnte im Vergleich zur Kultivierung ohne Adsorbens um 140 % gesteigert werden (**Abb. 2-12**).

Die Extraktion der Medien erfolgte bei pH 7 und bei pH 1,5, um neben Methylantranilat auch die korrespondierende freie Säure zu erfassen. Der Extrakt bei pH 1,5 wurde nach Methylierung mit Diazomethan mittels GC analysiert. Innerhalb der Nachweisgrenzen (**Tab. 2-3**) konnte jedoch keine freie Anthranilsäure detektiert werden.

2.2.5 Zusammenfassung

Die Versuche zur Steigerung der Methylantranilatkonzentration durch Zusatz von Precursoren und Variation des Nährmediums führten bislang nicht zu Produktausbeuten, die eine biotechnologische Erzeugung dieses Aromastoffes durch *P. cinnabarinus* wirtschaftlich erscheinen lassen. Die Ergebnisse nach Zusatz von

Lewatit belegen jedoch, dass die Ausbeuten durch *in situ* Adsorption der Zielverbindung gesteigert werden können.

2.3 Biosynthese und Produktion von Himbeerketon

Himbeerketon ist die „character impact compound“ des Himbeeraromas. Ayer und Singer [25] konnten die Verbindung bereits 1980 auch in Oberflächenkulturen des Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* nachweisen, was letztlich zu intensiven Untersuchungen zur biotechnologischen Gewinnung von Himbeerketon führte [26]. Dabei konnte BÖKER ausgehend von L-Phenylalanin zeigen, dass sich die Biosynthese im Pilz deutlich von derjenigen in der Himbeere unterscheidet. Er formulierte daraufhin ein hypothetisches Schema zur Bildung von Himbeerketon in *Nidula niveo-tomentosa* (**Abb. 3-4**).

Zur Verifizierung dieser Arbeitshypothese wurden zu Submerskulturen von *Nidula niveo-tomentosa* verschiedene metabolische Zwischenstufen des postulierten Sekundärstoffwechsels sowie Substanzen des Primärstoffwechsels zugesetzt und auf ihre Precursorwirkung untersucht. Nach Verwendung stabilisotopen-markierter Verbindungen wurde der Einbau der Markierungen mittels GC-AED verfolgt und anschließend massenspektrometrisch abgesichert.

2.3.1 Zusatz von Ring-²H₅-L-Phenylalanin

Als Precursor für die Himbeerketon-Biosynthese wurde ringdeutertes L-Phenylalanin (1 mM) zugesetzt, welches zuvor durch eine sauer katalysierte Substitution der Ring-Wasserstoffatome synthetisiert worden war (**4.6.3**).

Die flüchtigen Metabolite wurden aus dem Medium extrahiert und mittels GC-AED untersucht (**Abb. 2-13**). Dabei konnten Himbeerketon, Himbeeralkohol und 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on (**Abb. 2-14**) ringdeutert nachgewiesen werden.

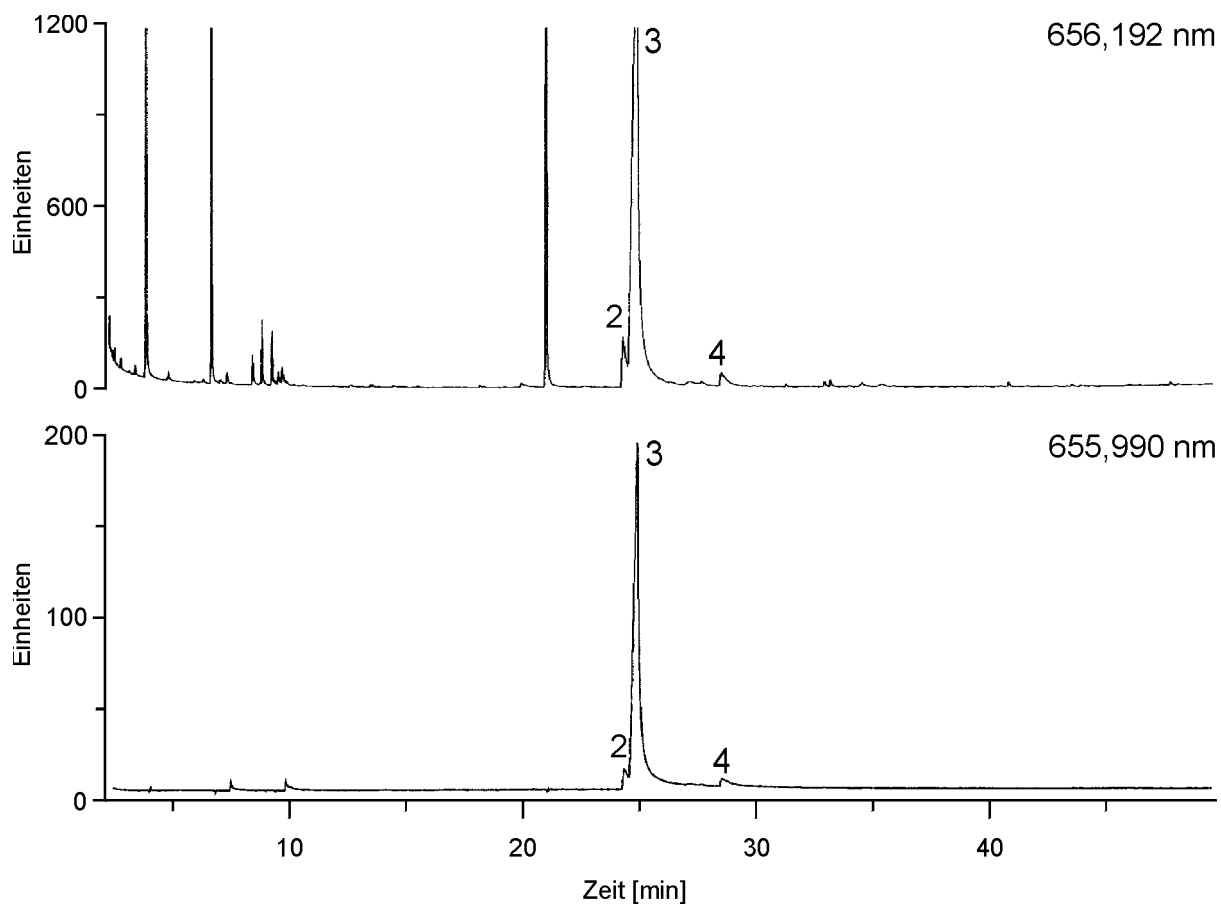


Abb. 2-13: GC-AED-Chromatogramm des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von Ring- $^2\text{H}_5$ -L-Phenylalanin (1mM), ^1H -Spur (656,192 nm) und ^2H -Spur (655,990 nm) 2 = HK, 3 = HA, 4 = 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on

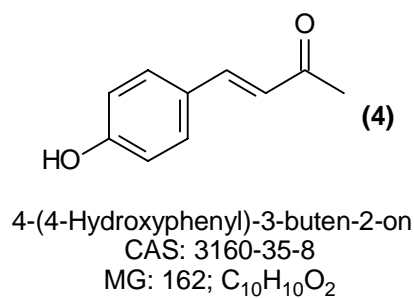


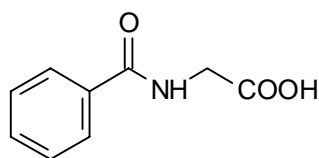
Abb. 2-14: 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on als Nebenprodukt der Himbeerketon-Biosynthese nach Zusatz von L-Phenylalanin

2.3.2 Seitenkettenabbau

2.3.2.1 Einsatz von Hippursäure als Precursor

Die Untersuchungen von Böker zur Biosynthese des Himbeerketons wiesen auf einen der Kettenverlängerung vorgeschalteten Abbau der Propylseitenkette des L-Phenylalanins und der davon abgeleiteten Precursoren hin. Als Intermediate entstehen dabei u. a. Benzoessäure bzw. 4-Hydroxybenzoyl-CoA. BÖKER versuchte sowohl durch Zusatz von Benzoessäure als auch von 4-Hydroxybenzoessäuremethylester als Precursoren eine Steigerung der Himbeerketonbildung zu erreichen. Während Benzoessäure zu einer geringen Erhöhung der Konzentrationen an Himbeerketon und Himbeeralkohol führte, wirkte 4-Hydroxybenzoessäuremethylester als bekanntes Mikrobizid erwartungsgemäß wachstumshemmend; eine Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol trat nicht auf [26].

Für weitere Untersuchungen bot sich als Precursor Hippursäure (**Abb. 2-15**) an, die einerseits den C_6H_5 -Körper der Benzoessäure liefert, andererseits aber für den Pilz weniger toxisch ist. Über eine Peptidbindung verknüpft enthält sie die Aminosäure L-Glycin, die vom Pilz zusätzlich als C- und N-Quelle genutzt werden kann.



Hippursäure
N-Benzoylglycin
CAS: 495-69-2
MG: 179; $C_9H_9NO_3$

Abb. 2-15: Hippursäure als Precursor für die Biosynthese von Himbeerketon

Hippursäure wurde 1829 erstmals von Liebig aus Pferdeharn isoliert und nach ihrer Herkunft benannt: Pferdeharnsäure (von griech.: hippos = Pferd und uron = Harn). Der Mensch scheidet täglich zwischen 1 und 2,5 g Hippursäure aus [15].

Die Kultivierung der beiden Stämme ATCC 38357 und CBS 380.80 erfolgte in SNL-Hefe- bzw. Sojapepton-Medium unter Zusatz von 1 bzw. 10 mmol L⁻¹ Hippursäure. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Kulturen ohne Precursor bzw. mit L-Phenylalanin (3 mM) mitgeführt.

Die **Abbildungen 2-16** und **2-17** zeigen die Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen am 12. Kulturtag in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und Art und Menge des zugesetzten Precursors.

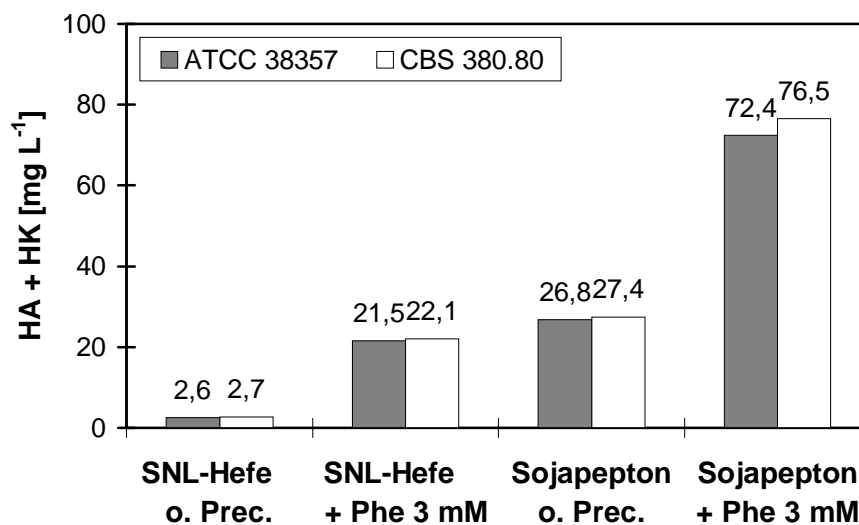


Abb. 2-16: Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen am 12. Kulturtag in SNL-Hefe-bzw. Sojapepton-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Phenylalanin (3 mM, 0. KT) als Precursor

In Sojapepton-Medium war bereits ohne Precursorzusatz eine relativ hohe Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol zu beobachten, während beide Produkte in SNL-Hefe-Medium ohne Precursor nur in sehr geringen Mengen nachweisbar waren. Im Vergleich zu den Kulturen ohne Precursor hatte der Zusatz von Hippursäure einen deutlich positiven und mit L-Phenylalanin vergleichbaren Einfluss auf die Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol. Die effektivste Produktbildung am 12. Kulturtag mit Mengen von ca. 80 mg L⁻¹ wurde durch Zusatz von 1 mmol L⁻¹ Hippursäure zu Sojapepton-Medium erreicht.

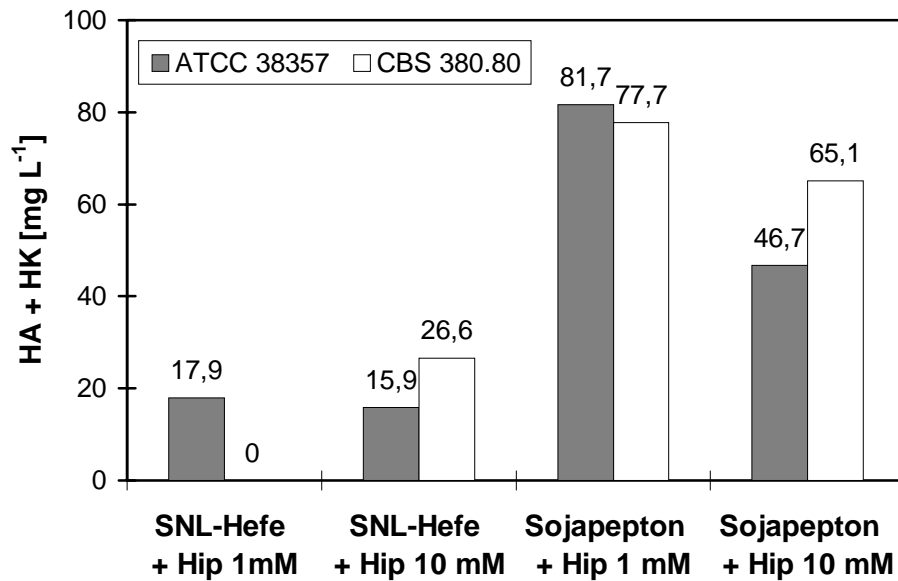


Abb. 2-17: Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen am 12. Kulturtag in SNL-Hefe-bzw. Sojapepton-Medium mit Hippursäure (1 bzw. 10 mM, 0. KT) als Precursor, *N. niveo-tomentosa* ATCC 38357 und CBS 380.80

Abbildung 2-18 zeigt beispielhaft die Bildungskinetik von Himbeerketon und Himbeeralkohol in den in Sojapepton-Medium gewachsenen Kulturen des Stammes *N. niveo-tomentosa* CBS 380.80.

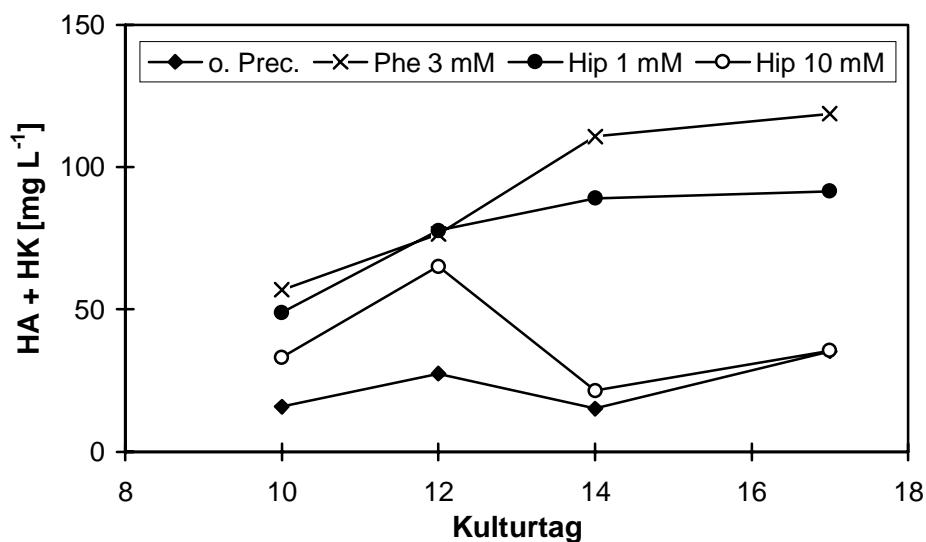


Abb. 2-18: Zeitlicher Verlauf der Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne Precursor bzw. mit L-Phenylalanin oder Hippursäure als Precursor, *N. niveo-tomentosa* CBS 380.80

Die Konzentration an Himbeerketon und Himbeeralkohol in den Kulturen mit 1 mmol L⁻¹ Hippursäure erreichte bis zum 17. Kulturtag ca. 95 mg L⁻¹. In den Kulturen mit L-Phenylalanin lag das Maximum trotz der dreifachen Precursormenge mit ca. 115 mg L⁻¹ nur geringfügig über diesem Wert. Eine Erhöhung des Zusatzes an Hippursäure auf 10 mmol L⁻¹ führte nicht zu einer weiteren Steigerung der Produktkonzentrationen, sondern wirkte sich deutlich negativ darauf aus.

Teilzusammenfassung:

- Hippursäure ist als Precursor wirksam, was den hypothetischen Biosyntheseweg von BÖKER bestätigt.
- Im Hinblick auf eine biotechnologische Erzeugung von Himbeerketon bietet Hippursäure aufgrund des niedrigeren Preises und der besseren Precursorwirksamkeit eine sinnvolle Alternative zu L-Phenylalanin.
- Die Produktausbeute kann durch Erhöhung der zugesetzten Menge an Hippursäure nicht beliebig gesteigert werden.

2.3.2.2 Zusatz von 2-¹³C-L-Phenylalanin

Da stabilisotopen-markierte Verbindungen in der Regel unempfindlicher als radioaktiv-markierte Tracer detektiert werden können, müssen größere Mengen an Precursor eingesetzt werden, was zu Störungen des normalen Metabolismus führen kann [40,41]. BÖKER [26] beobachtete beim Einsatz von 1-¹³C-markiertem L-Phenylalanin (10 mM) jedoch keine „Isotopeneffekte“. Die markierten Verbindungen wurden deshalb in vergleichbaren Konzentrationen wie die unmarkierten eingesetzt.

Der Abbau der Propylseitenkette bis zur C₆C₁-Stufe erschien in Kenntnis der Biosynthese in der Himbeere zunächst zu umständlich und daher wenig wahrscheinlich. Böker hatte jedoch nach Zusatz von 1-¹³C-L-Phenylalanin die Markierung nicht im Himbeerketon nachgewiesen [26]. Deshalb wurde zunächst 2-¹³C-markiertes L-Phenylalanin eingesetzt (**Abb. 2-19**).

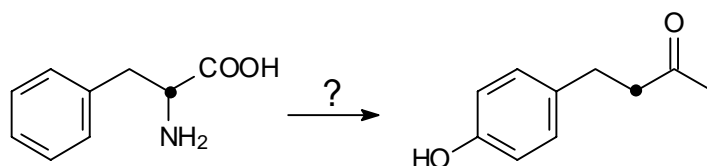


Abb. 2-19: Mögliche Metabolisierung von 2-¹³C-L-Phenylalanin zu Himbeerketon
• = ¹³C-Atom

Der Zusatz von 50 mg pro 100 mL 2-¹³C-L-Phenylalanin (ca. 3 mM) erfolgte nach Lösen in wenig Medium und anschließender Sterilfiltration, um temperaturbedingte Veränderungen des Precursors während des Autoklavierens zu vermeiden.

Die gebildeten Metabolite wurden mit Pentan/Diethylether aus dem Medium isoliert (siehe 4.3.2) und mittels GC-AED und GC-MS untersucht.

Im GC-AED-Chromatogramm war auf der ¹³C-Spur kein Signal sichtbar. Mittels GC-MS wurde ebenfalls kein Einbau der Stabilisotopen-Markierung in Himbeerketon und Himbeeralkohol detektiert.

2.3.2.3 Zusatz von 3-¹³C-L-Phenylalanin

Der Precursor-Zusatz erfolgte wie unter 2.3.2.2. Die gebildeten Metabolite wurden mit Pentan/Diethylether aus dem Medium isoliert (siehe 4.3.2) und mittels GC-AED und GC-MS untersucht.

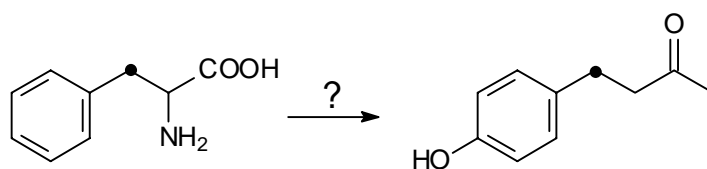


Abb. 2-20: Mögliche Metabolisierung von 3-¹³C-L-Phenylalanin zu Himbeerketon
• = ¹³C-Atom

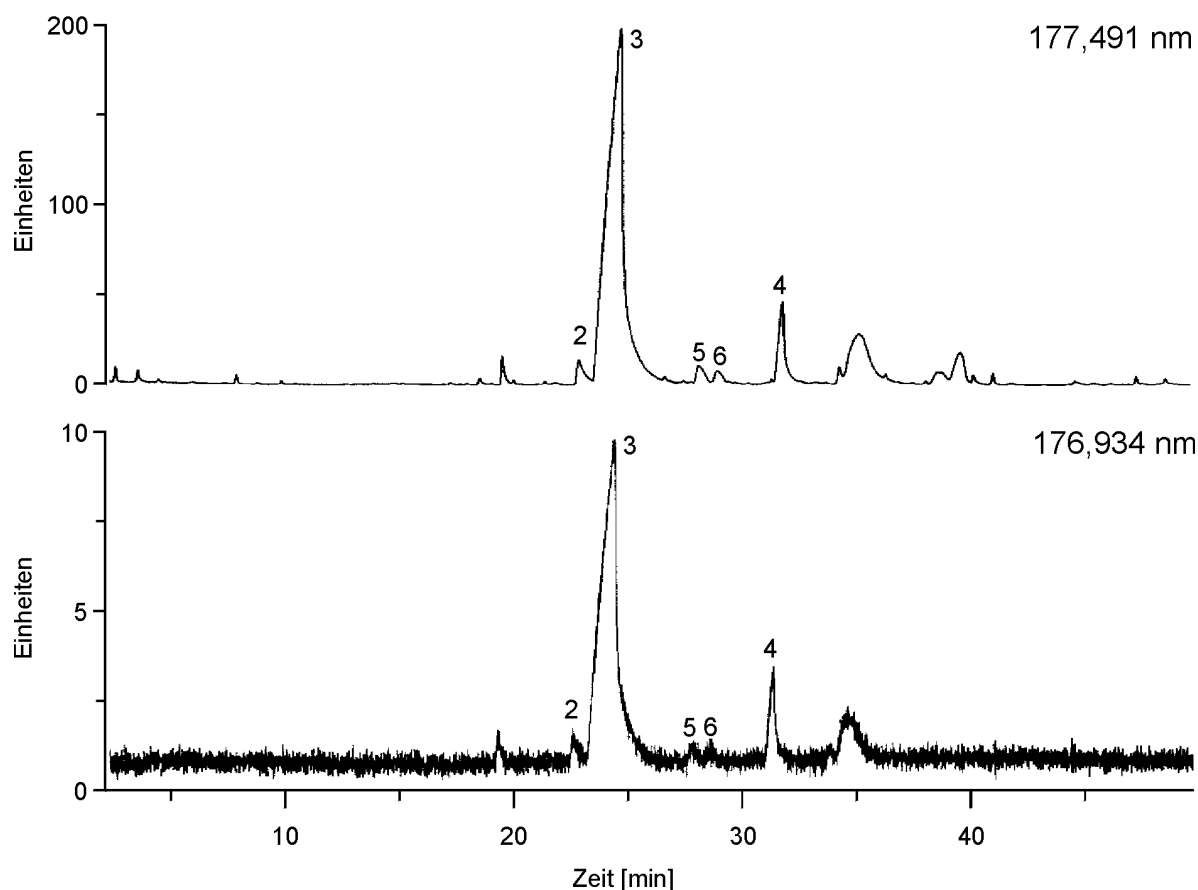


Abb. 2-21: GC-AED-Chromatogramme des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von 3-¹³C-L-Phenylalanin (3 mM, 0. KT), ¹²C-Spur (177,491 nm) und ¹³C-Spur (176,934 nm), 2 = HK, 3 = HA, 4 = 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on

Abbildung 2-21 zeigt die ¹²C- und ¹³C-Spuren des GC-AED-Chromatogramms. Die markierten Zielverbindungen sind auf der ¹³C-Spur deutlich erkennbar, obwohl das Verhältnis ¹²C:¹³C im Molekül 9:1 beträgt und aufgrund des im Soja-Mediums enthaltenen L-Phenylalanins nicht ausschließlich ¹³C-markierte Zielverbindungen vorliegen dürften.

Setzt man ausgehend von identischen Nachweisgrenzen (**Tab. 2-3**) für ¹²C und ¹³C gleiche Responsefaktoren voraus, so kann über die Flächenverhältnisse der Anteil an markierter Substanz berechnet werden. Im vorliegenden Fall ergibt sich für den Himbeeralkohol ein Anteil von 45 % ¹³C-markierter Substanz (**Tab. 4-6**).

Beim Vergleich der Massenspektren (**Abb. 2-22**) mit denen der unmarkierten Verbindungen (s. Anhang **Abb. 5-1**) sind deutlich intensivere Isotopenpeaks mit

m/z 165 (Himbeerketon) bzw. m/z 167 (Himbeeralkohol) zu erkennen. Auch aus den jeweiligen relativen Intensitäten (s. Anhang) lassen sich die Verhältnisse der unmarkierten zu den markierten Verbindungen berechnen. Danach liegen Himbeerketon und Himbeeralkohol jeweils zu etwa 44 % in markierter Form vor.

Das Massenspektrum des Himbeerketons (**Abb. 2-22 (2a)**) zeigt einen intensiven Molekülpeak $M^{+\bullet}$ bei m/z 165 (unmarkiert m/z 164). Als primäre Fragmentierung erfolgt eine α -Spaltung der C-C-Bindung in benzyllischer Stellung. Dabei entsteht unter Ringerweiterung ein Hydroxytropyliumion mit m/z 108 (unmarkiert m/z 107), welches leicht unter Verlust von CO und H₂ zerfällt und schließlich das Phenylkation mit m/z 78 (unmarkiert m/z 77) liefert [42,43]. Daneben führt die α -Spaltung in Nachbarschaft zur Ketogruppe zu den Fragmenten $\text{HOPh}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^+$ mit m/z 150 (unmarkiert m/z 149) sowie $\text{HOPh}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2^+$ mit m/z 122 (unmarkiert m/z 121) und CH_3CO^+ mit m/z 43.

Das Massenspektrum des Himbeeralkohols (**Abb. 2-22 (3a)**) zeigt einen deutlichen Molekülpeak $M^{+\bullet}$ bei m/z 167 (unmarkiert m/z 166). Analog zum Himbeerketon erfolgt zunächst die α -Spaltung der C-C-Bindung in benzyllischer Stellung, die auch hier zu den Fragmenten m/z 108 und m/z 78 führt. Daneben liefert die Spaltung des sekundären Alkohols in Nachbarschaft zur OH-Gruppe die Fragmente $\text{HOPh}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2^+$ mit m/z 122 (unmarkiert m/z 121) und $\text{CH}_3\text{CH}^+\text{OH}$ mit m/z 45. Abspaltung eines Methylradikals und anschließende 1,4-Eliminierung von Wasser führt zu $\text{HOPh}^{13}\text{CH}_2\text{CHCH}^+$ mit m/z 134 (unmarkiert m/z 133). Deutlich zu erkennen ist auch die direkte Wassereliminierung, die zu dem Fragment mit m/z 149 (unmarkiert m/z 148) führt.

Der Precursor L-Phenylalanin wird also vor dem Einbau in die Zielverbindungen bis zur C₆-C₁-Stufe abgebaut, woran sich eine Kettenverlängerung anschließen muss. Falls diese gemäß dem hypothetischem Biosyntheschema (**Abb. 3-4**) über Malonyl-CoA erfolgt, sollte die Produktion an Himbeeralkohol bzw. Himbeerketon durch Zugabe von Malonyl-Einheiten gesteigert werden können.

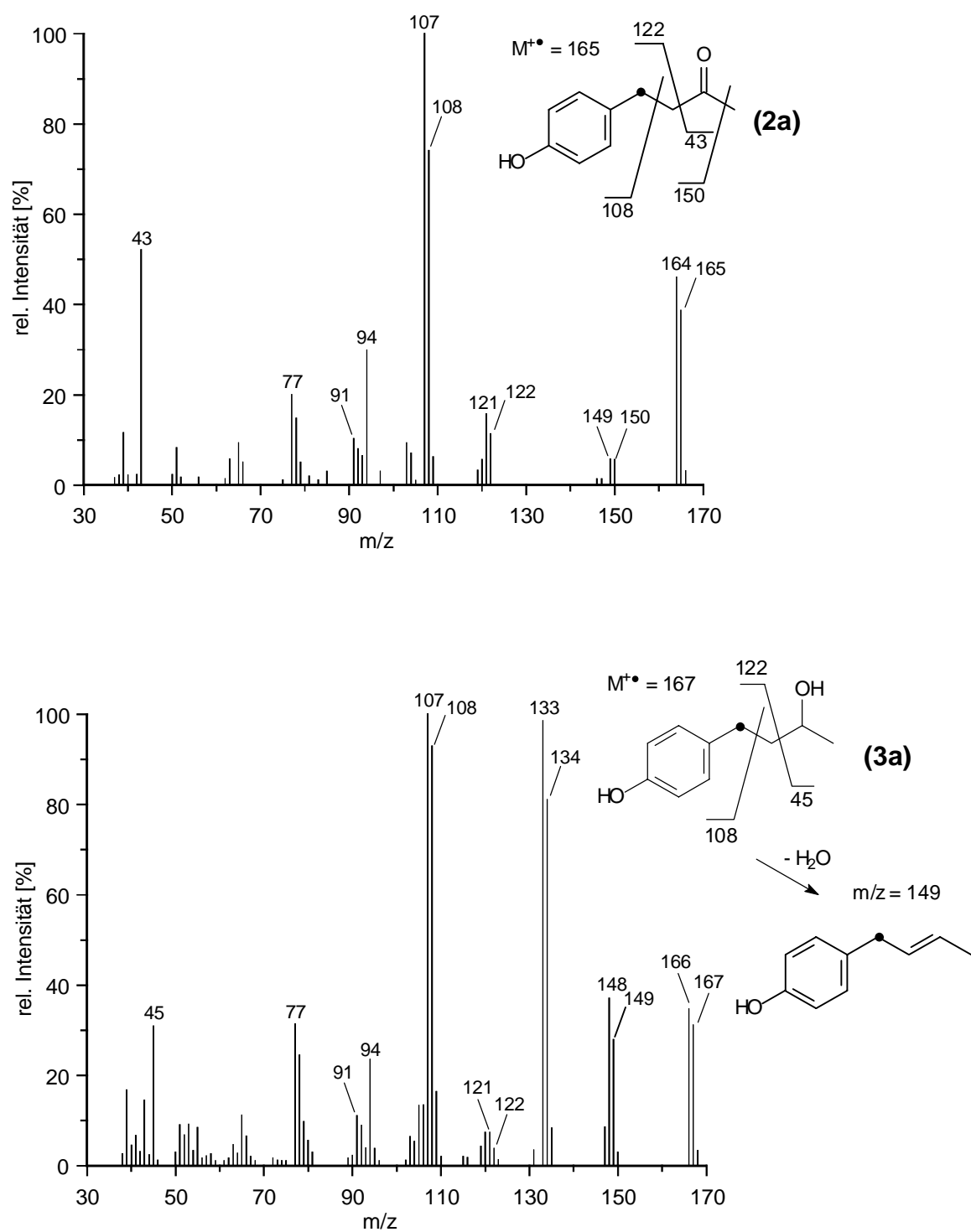


Abb. 2-22: Massenspektren von Himbeerketon (**2a**) und Himbeeralkohol (**3a**) nach Zusatz von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin (3 mM) als Precursor

2.3.3 Seitenkettenaufbau

Wie aus den vorangegangenen Versuchen deutlich wurde, entstammt der aromatische Ring der Zielverbindungen dem Precursor L-Phenylalanin, wohingegen dessen Propylseitenkette bis zum C₆C₁-Körper abgebaut wird. Der erneute Aufbau der Seitenkette bis hin zum C₆C₄-Körper der phenylbutanoiden Substanzen war Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

2.3.3.1 Teilweiser Ersatz der Glucose durch C₂- bzw. C₃-Bausteine

BÖKER postulierte in seinem hypothetischen Biosyntheschema eine Kettenverlängerung mittels Malonyl-CoA, welches im Organismus aus Acetyl-CoA und damit hauptsächlich aus der C-Quelle gewonnen wird. Ein direkter Zusatz von Malonat in Form des Natriumsalzes oder als Dimethylester und von Vorläufersubstanzen wie Acetat oder Pyruvat könnte sich nicht nur konzentrationssteigernd auswirken, sondern möglicherweise gleichzeitig die Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol beschleunigen.

Die Kultivierung erfolgte in Sojapepton-Medium mit reduziertem Glucosegehalt bei teilweisem Ersatz der Glucose durch Natriumacetat, Natriumpyruvat, Dinatriummalonat, Dimethylmalonat bzw. L-Alanin. Als Precursor wurde wiederum Hippursäure zugesetzt.

Die Ausbeuten an Himbeerketon und Himbeeralkohol lagen deutlich unter den Werten, die in Sojapepton-Medium ohne Precursor erreicht wurden. Auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet.

2.3.3.2 Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase

Das für Kettenverlängerungen benötigte Malonyl-CoA entsteht in der Regel durch Carboxylierung von Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC, EC 6.4.1.2) [44]. Dieses Enzym kann durch verschiedene Arylphenoxypropansäure-derivate wie beispielsweise Diclofop-methyl (**Abb. 3-12**) gehemmt werden.

Die Hemmung der ACC führt zu einem Mangel an Malonyl-CoA, das entsprechend dem hypothetischen Biosynthese-Schema (**Abb. 3-4**) zum Aufbau des Himbeerketons benötigt wird. Bei gleichbleibendem Zusatz von L-Phenylalanin als Precursor sollte sich dies in einer Verringerung der Produktkonzentrationen äußern.

Die Kulturen mit $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Diclofop-methyl zeigen bereits erste Veränderungen gegenüber den Kulturen ohne Inhibitor (**Abb. 2-23**). Bei Zusatz von 1 mmol L^{-1} Diclofop-methyl ergab sich schließlich ein völlig verändertes Spektrum an flüchtigen Substanzen. Die nach Extraktion der Kulturmedien bei pH 7 bzw. pH 1,5 und anschließender Methylierung mit Diazomethan identifizierten Verbindungen sind in **Tabelle 2-5** aufgelistet.

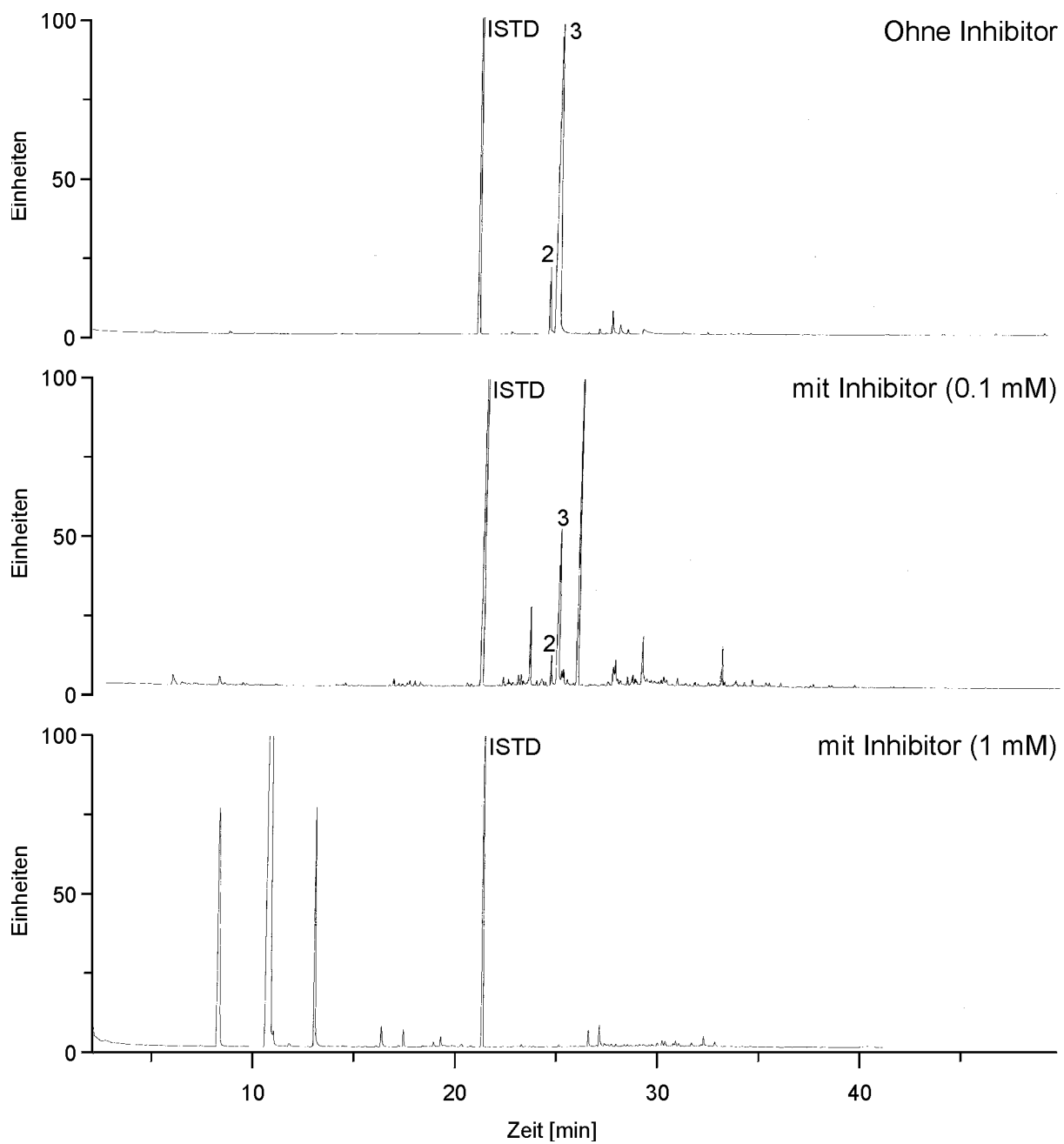


Abb. 2-23: GC-FID-Chromatogramme der Pentan/Diethylether-Extrakte von Kulturen ohne Inhibitor bzw. mit Diclofop-methyl (0,1 bzw. 1 mM, 0. KT) als Inhibitor

Tab. 2-5: Identifizierte Verbindungen in Kulturen ohne bzw. mit Diclofop-methyl (0,1 bzw. 1 mM) als Inhibitor; Extraktion der Kulturmedien bei pH 1,5 und pH 7

Verbindung	KI (Lit. [45,46])	o. Inhib.	Konzentration [mg L ⁻¹]	
			0,1 mM Inhib.	1 mM Inhib.
Himbeerketon	1523	0,7	0,7	< 0,05
Himbeeralkohol	1533	8,7	7,7	< 0,05
3-Hydroxy-3-phenyl-propansäure	1505	1,1	0,1	1,2
Hexadecan	1562 (1600)	2,8	1,9	< 0,05
4-Methoxybenzoesäure	1345			1,1
Phenyllessigsäure	1154 (1154)			2,9
Benzoessäure	1066 (1078)			0,6
Benzaldehyd	1047 (947)			4,9
Phenylmethanol	1137 (1033)			25,1
2-Phenylethanol	1220 (1104)			2,8
4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on	1635	0,2	0,2	

Teilzusammenfassung:

- Durch den Zusatz an Diclofop-methyl wird die Produktion von Himbeerketon und Himbeeralkohol gehemmt. Anstelle der phenylbutanoiden Substanzen entstehen v. a. kurzkettige und leichter flüchtige Verbindungen.
- Am Aufbau der Seitenkette der Zielverbindungen scheint Malonyl-CoA maßgeblich beteiligt zu sein.

2.3.3.3 Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase und gleichzeitiger Zusatz von Dimethylmalonat

Um den durch die Hemmung der ACC hervorgerufenen Mangel an Malonyl-CoA zu kompensieren, wurde dem Kulturmedium Dimethylmalonat zugegeben.

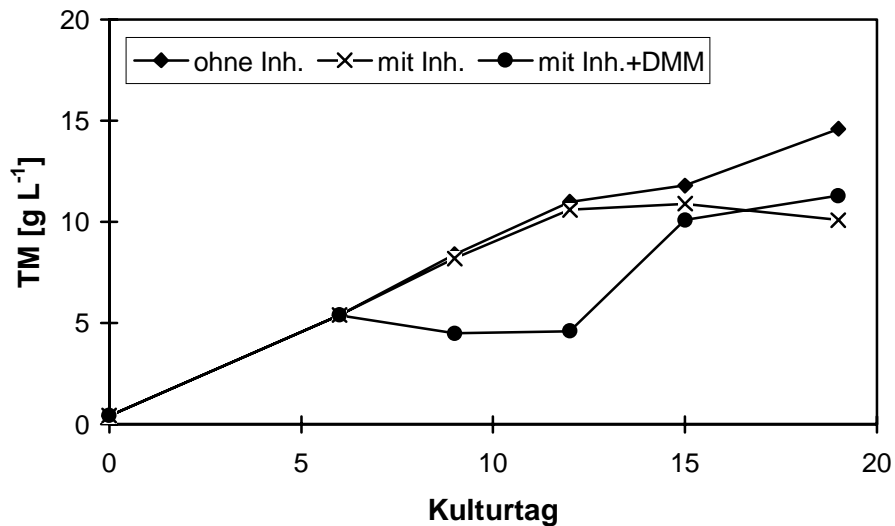


Abb. 2-24: Wachstumsverlauf der Kulturen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“

Auf das Wachstum des Pilzes hatte der Zusatz von Diclofop-methyl nahezu keinen Effekt (**Abb. 2-24**). Bei gleichzeitiger Gabe von Dimethylmalonat stagnierte das Wachstum bis etwa zum 12. Kulturtag um danach einen ähnlichen Wert zu erreichen wie in den Kulturen ohne Inhibitor.

Die Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen lagen in den Kulturen mit Inhibitor deutlich unter den Werten, die ohne Hemmung der ACC erreicht wurden (**Abb. 2-25**). Der Zusatz von Dimethylmalonat hatte auf die Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol keinen Einfluss.

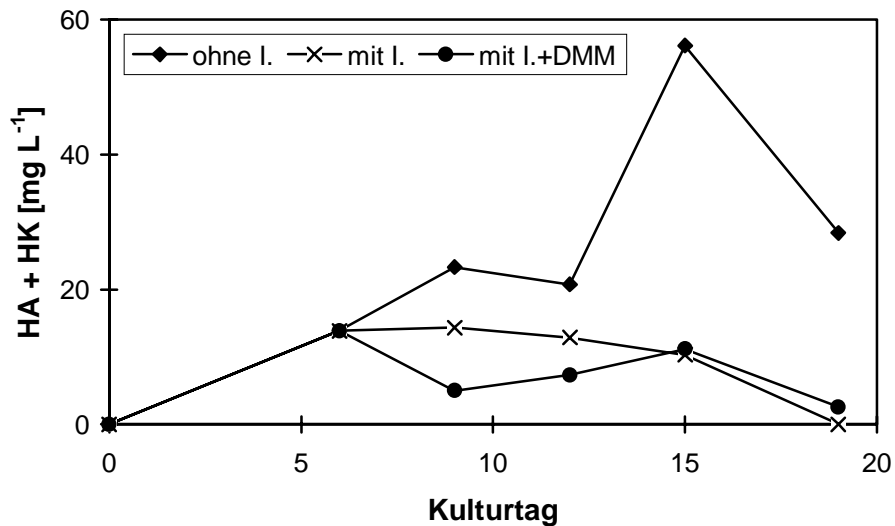


Abb. 2-25: Zeitlicher Verlauf der Himbeerketon- und Himbeeralkoholkonzentrationen in Kulturen ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“

Dagegen stiegen die Konzentrationen an C_6C_1 - und C_6C_2 -Verbindungen wie Benzaldehyd (**Abb. 2-26**), Phenylmethanol (**Abb. 2-27**) und Phenylethanol (**Abb. 2-28**) im Vergleich zu den Kulturen ohne Inhibitor insbesondere gegen Ende der Kulturzeit deutlich an.

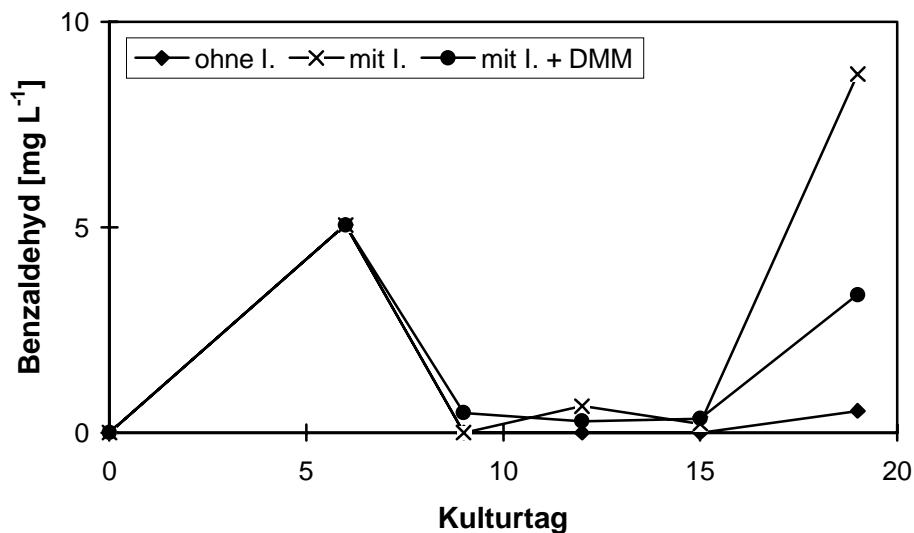


Abb. 2-26: Zeitlicher Verlauf der Benzaldehydkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“

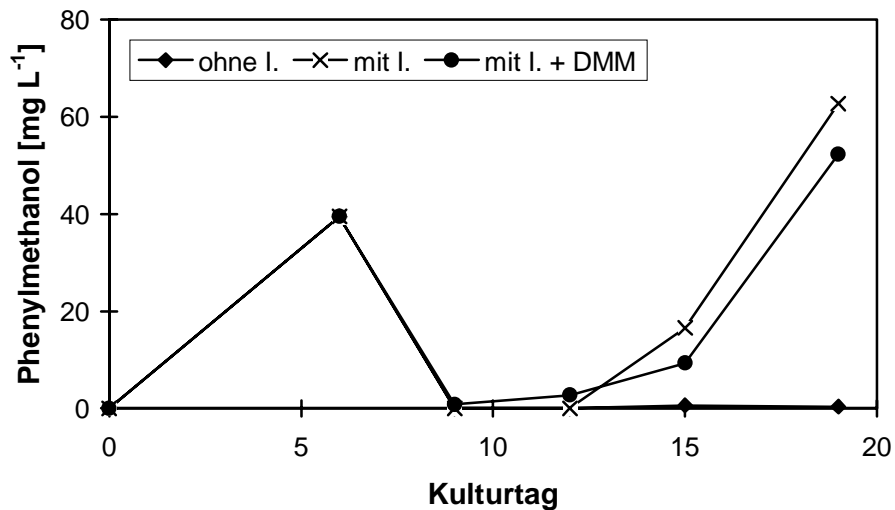


Abb. 2-27: Zeitlicher Verlauf der Phenylmethanolkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“

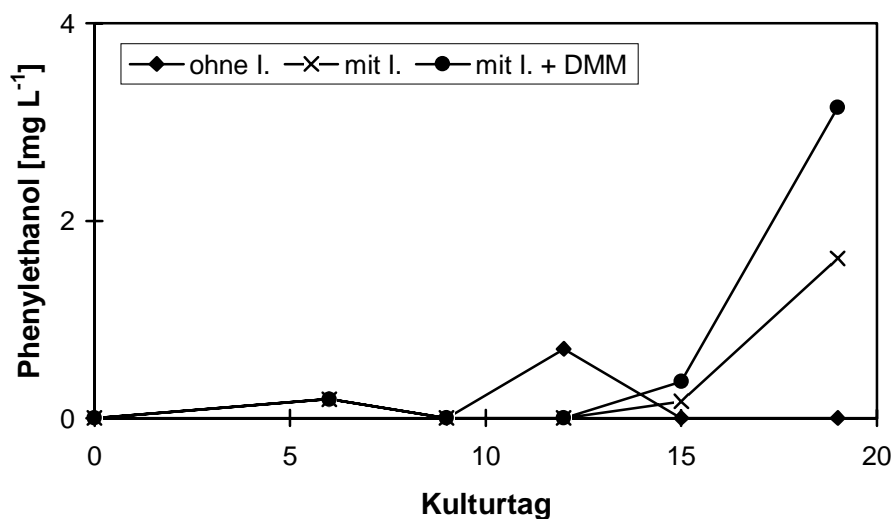


Abb. 2-28: Zeitlicher Verlauf der Phenylethanolkonzentrationen in Sojapepton-Medium ohne und mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) bzw. mit Inhibitor (0,5 mM, 6. KT) und Dimethylmalonat (20 mM, 6. KT) als „Precursor“

Teilzusammenfassung:

- Durch den Zusatz von Dimethylmalonat als „Precursor“ wurden die Ausbeuten an Himbeerketon und Himbeeralkohol nicht gesteigert.

-
- Bei Zusatz eines ACC-Inhibitors wurden anstelle der phenylbutanoiden Zielverbindungen vermehrt Benzaldehyd, Phenylmethanol und Phenylethanol gebildet.
 - Der Mangel an Malonyl-CoA, den die Inhibierung der Acetyl-CoA-Carboxylase hervorruft, konnte durch Zusatz von Dimethylmalonat im Hinblick auf die Bildung von Himbeerketon nicht kompensiert werden.

2.3.3.4 Zusatz von 1-¹³C-markierter Glucose

Keiner der Zusatzversuche mit kurzkettigen „Precursoren“ für den Aufbau der Seitenkette in den Zielverbindungen führte zu einer Steigerung der Produktausbeuten. Das für den Aufbau der Seitenkette der phenylbutanoiden Verbindungen benötigte Malonyl-CoA entstammt offensichtlich dem regulären Stoffwechsel und damit insbesondere der D(+)-Glucose als C-Quelle des Kulturmediums. Zum experimentellen Beweis dieser Annahme wurde 1-¹³C-markierte Glucose als Kohlenhydratquelle eingesetzt.

D(+)-Glucose wird sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Organismus über Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu Acetyl-CoA metabolisiert [44]. Setzt man 1-¹³C-markierte Glucose ein, so entsteht daraus 2-¹³C-markiertes Acetyl-CoA und nach Carboxylierung 2-¹³C-markiertes Malonyl-CoA (**Abb. 3-13**). Geht man bei der Himbeerketon-Biosynthese von einem Seitenkettenaufbau durch Kondensation eines C₆-C₁-Körpers mit zwei Malonyl-CoA-Einheiten aus, würde sich die Markierung am C1- und C3-Atom des Himbeerketons und Himbeeralkohols wiederfinden (**Abb. 3-14**).

Die Kultivierung erfolgte in Sojapepton-Medium mit 30 g L⁻¹ 1-¹³C-D(+)-Glucose und 10 mmol L⁻¹ L-Phenylalanin in drei 20 mL-Ansätzen. Am 12. KT wurden die Kulturen aufgearbeitet und die flüchtigen Bestandteile durch Flüssig/Flüssig-Extraktion isoliert (**4.3.2**).

In **Abbildung 2-29** sind die ^{12}C - und ^{13}C -Spuren des AED-Chromatogramms dargestellt. Auf der ^{13}C -Spur sind vier Peaks deutlich zu erkennen. Anhand ihrer Retentionsindices sowie mittels GC-MS konnten Himbeerketon und Himbeeralkohol eindeutig identifiziert werden.

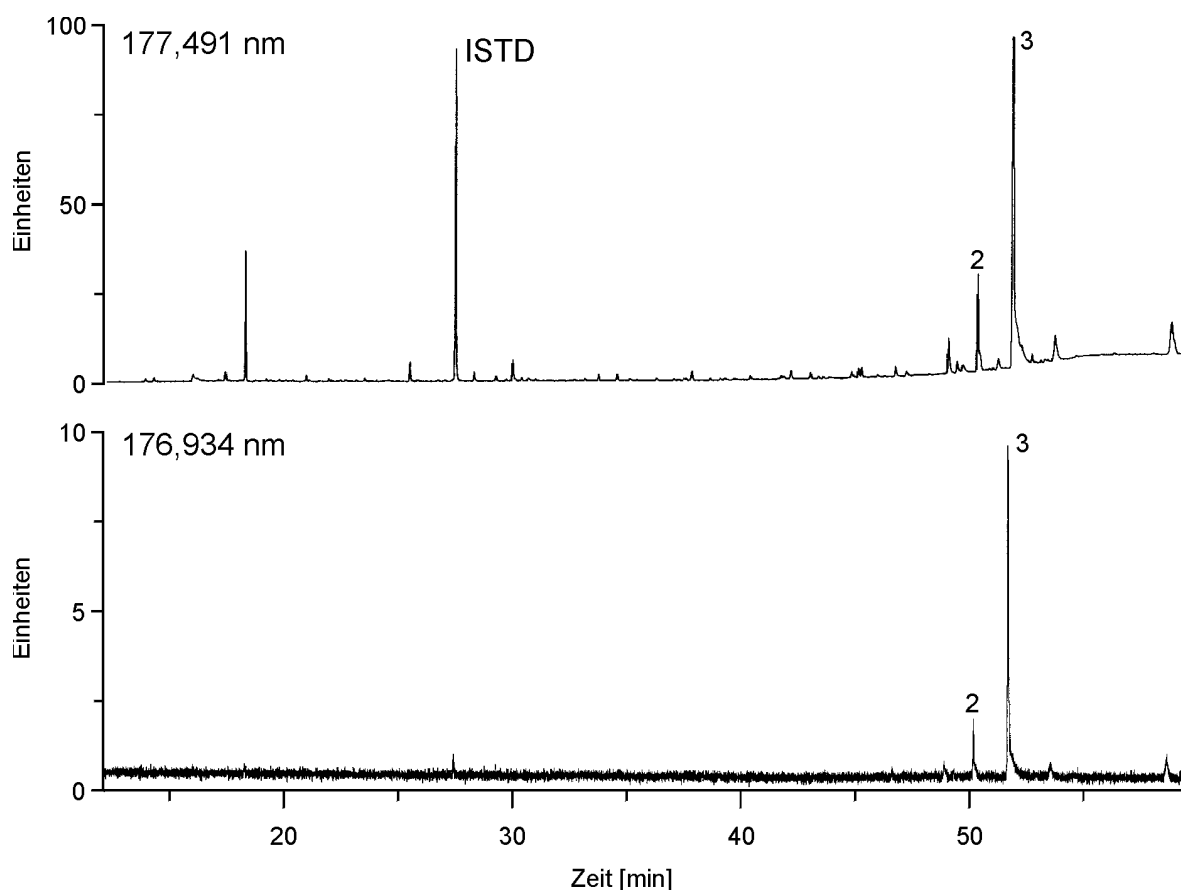


Abb. 2-29: GC-AED-Chromatogramme des Pentan/Diethylether-Extraktes nach Zusatz von 1- ^{13}C -D(+)-Glucose, ^{12}C -Spur (177,491 nm) und ^{13}C -Spur (176,934 nm)
2 = HK, 3 = HA

Aus dem Verhältnis der Peakflächen wurde ein Anteil an markiertem Himbeeralkohol von 45 % berechnet (**Tab. 4-6**).

Das Massenspektrum des Himbeerketons (**Abb. 2-30 (2b)**) zeigt einen deutlichen Molekülpeak $\text{M}^{+\bullet}$ bei m/z 164. Im Vergleich zum Spektrum der unmarkierten Verbindung (siehe Anhang **Abb. 5-1**) sind deutlich intensivere Isotopenpeaks mit m/z 165 und 166 zu erkennen. Diese entsprechen ein- bzw. zweifach- ^{13}C -markiertem

Himbeerketon. Aus den jeweiligen Intensitätsverhältnissen (s. Anhang) lässt sich der Anteil einfach markierter Form berechnen. Er beträgt beim Himbeerketon etwa 24,4 %.

Da sich die Markierungen in den Positionen 1 und/oder 3 der Butylseitenkette befinden, liefert die α -Spaltung der C-C-Bindung in benzyllischer Stellung analog zur unmarkierten Verbindung das Hydroxytropyliumion mit m/z 107 und nach Verlust von CO und H₂ das Phenylkation mit m/z 77. Daneben führt die α -Spaltung in Nachbarschaft zur Ketogruppe zu den Fragmenten HOPhCH₂¹³CH₂CO⁺ mit m/z 150 (unmarkiert m/z 149) sowie HOPhCH₂¹³CH₂⁺ mit m/z 122 (unmarkiert m/z 121) und ¹³CH₃CO⁺ mit m/z 44 (unmarkiert m/z 43).

Der Molekülpeak des Himbeeralkohols wird bei m/z 166 registriert (**Abb. 2-30 (3b)**). Auch hier sind deutlich intensivere Isotopenpeaks mit m/z 167 und 168 zu erkennen als im Spektrum der unmarkierten Verbindung (vgl. Anhang **Abb. 5-1**). Diese entsprechen den Molekülpeaks M^{•+} der einfach- und zweifach-¹³C-markierten Formen des Himbeeralkohols. Der Anteil an einfach-markiertem Himbeeralkohol, berechnet aus den Intensitätsverhältnissen (s. Anhang) beträgt etwa 14,3 %.

Die α -Spaltung der benzyllischen C-C-Bindung liefert das Hydroxytropyliumion mit m/z 107 und nach Verlust von CO und H₂ das Phenylkation mit m/z 77. Daneben führt die α -Spaltung des sekundären Alkohols in Nachbarschaft zur OH-Gruppe zu den Fragmenten HOPhCH₂¹³CH₂⁺ mit m/z 122 (unmarkiert m/z 121) und ¹³CH₃CH⁺OH mit m/z 46 (unmarkiert m/z 45). Durch Abspaltung eines Methylradikals und anschließende 1,4-Eliminierung von Wasser entsteht HOPhCH₂¹³CHCH⁺ mit m/z 134 (unmarkiert m/z 133). Deutlich zu erkennen ist auch die direkte Wassereliminierung, die in diesem Falle zu den Fragmenten m/z 150 und m/z 149 (unmarkiert 148) führt.

Weder Himbeerketon noch Himbeeralkohol liegen erwartungsgemäß vollständig in markierter Form vor. Aus einem Molekül 1-¹³C-Glucose entstehen zwei Moleküle Acetyl- bzw. Malonyl-CoA, von denen jeweils nur eines eine ¹³C-Markierung trägt. Zudem finden sich in einem komplexen Medium wie dem verwendeten Sojapepton-Medium weitere Acetyl-CoA-Quellen wie beispielsweise Fettsäuren und Amino-

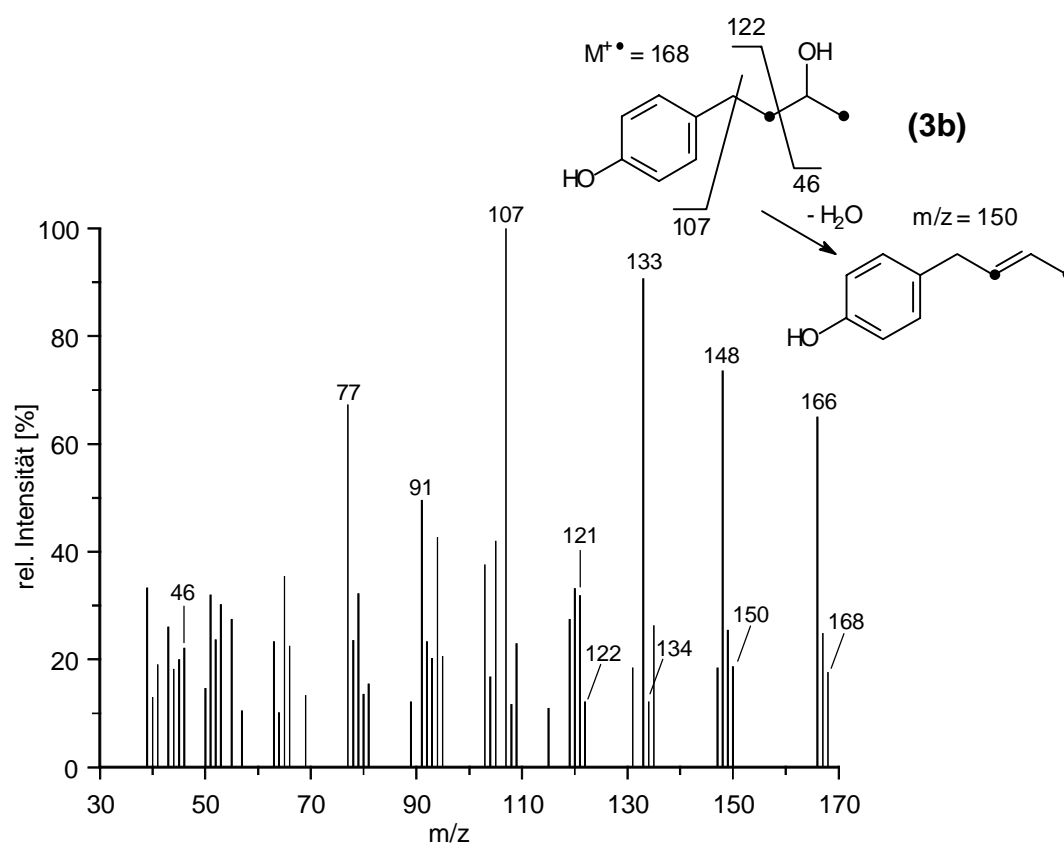
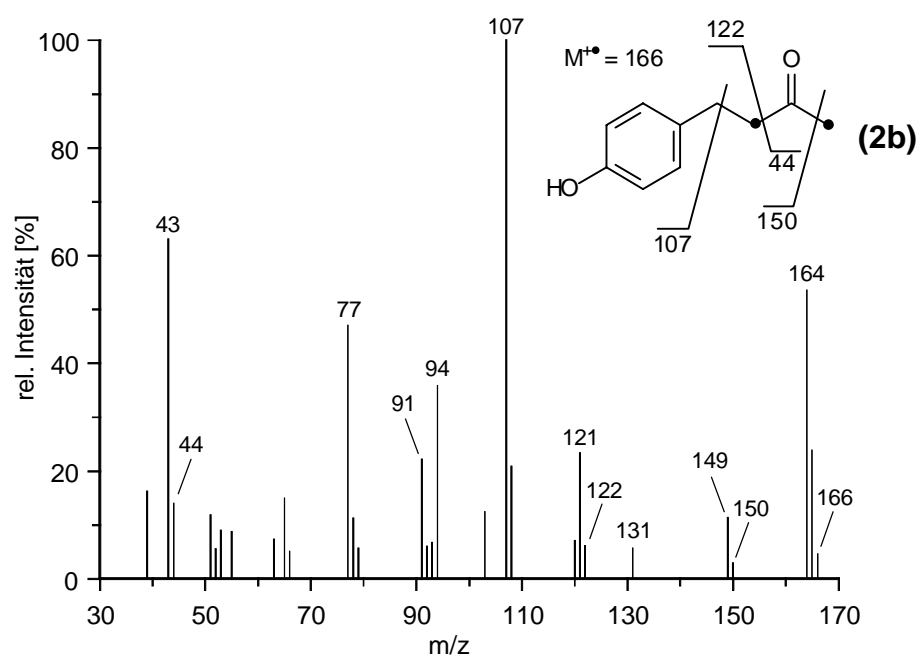


Abb. 2-30: Massenspektren von Himbeerketon (**2b**) und Himbeeralkohol (**3b**) nach Kultivierung mit 1- ^{13}C -D(+)-Glucose als C-Quelle, • = ^{13}C -Atom

säuren, einschließlich des zudosierten L-Phenylalanins, die der Pilz zum Aufbau der Zielverbindungen nutzen kann.

Teilzusammenfassung:

- Glucose wird in Form von Acetyl- bzw. Malonyl-CoA für den Aufbau der Seitenkette im Himbeerketon und Himbeeralkohol genutzt.
- Bei der Synthese der Zielverbindungen erfolgt eine zweifache Kettenverlängerung mit Acetyl- bzw. Malonyl-CoA.

2.3.3.5 Weitere Sekundärmetabolite

Neben Himbeerketon und Himbeeralkohol enthielten zwei weitere Substanzen ¹³C-Markierungen (**Abb. 2-29**). Die zugehörigen Massenspektren sind in **Abbildung 2-31** dargestellt. In Kulturen mit nicht markierter Glucose wurden die entsprechenden unmarkierten Verbindungen gebildet (s. Anhang **Abb. 5-2**).

Die Molekülpeaks M⁺ bei m/z 196 sind in beiden Spektren deutlich zu erkennen, wobei die Intensitäten der Isotopenpeaks m/z 197 und m/z 198 nach Zusatz der markierten D(+)-Glucose deutlich erhöht sind. Beide Spektren weisen vergleichbare Fragmente in etwas unterschiedlichen Intensitäten auf.

Das Molekulargewicht von 196 deutete auf Zingerol hin, welches bereits von BÖKER in Kulturen von *N. niveo-tomentosa* nachgewiesen worden war [26]. MS-Fragmentierungsschemata in Verbindung mit Retentionsindices standen allerdings zur Identifizierung nicht zur Verfügung. Durch Variation der Stellung der Methoxy- bzw. Hydroxygruppe am aromatischen Ring sind mehrere Stellungsisomere des Zingerols mit geringfügig unterschiedlichen Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Untersuchung denkbar, allerdings bislang nicht in der Literatur beschrieben.

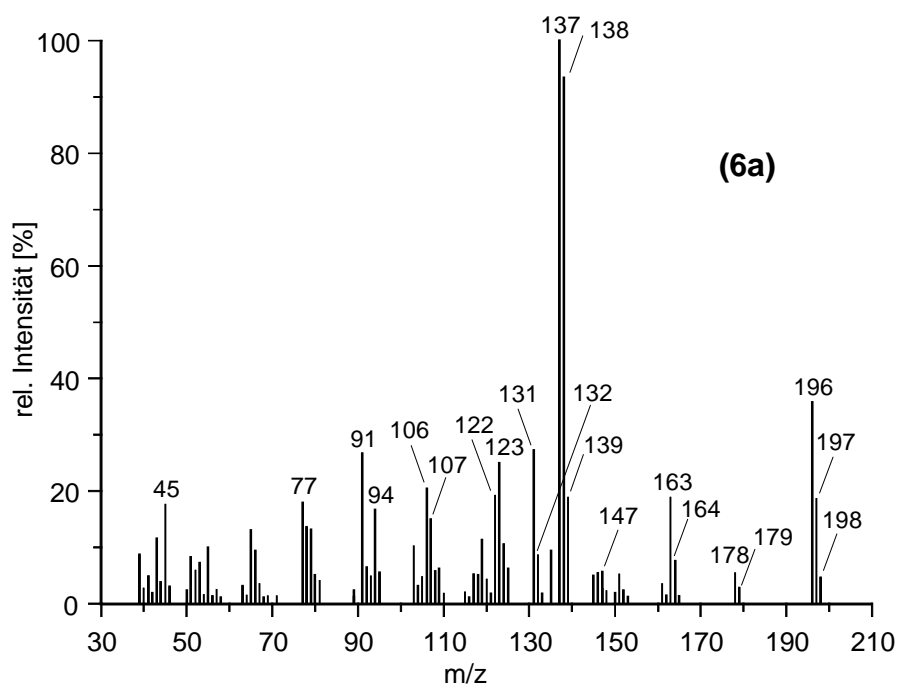
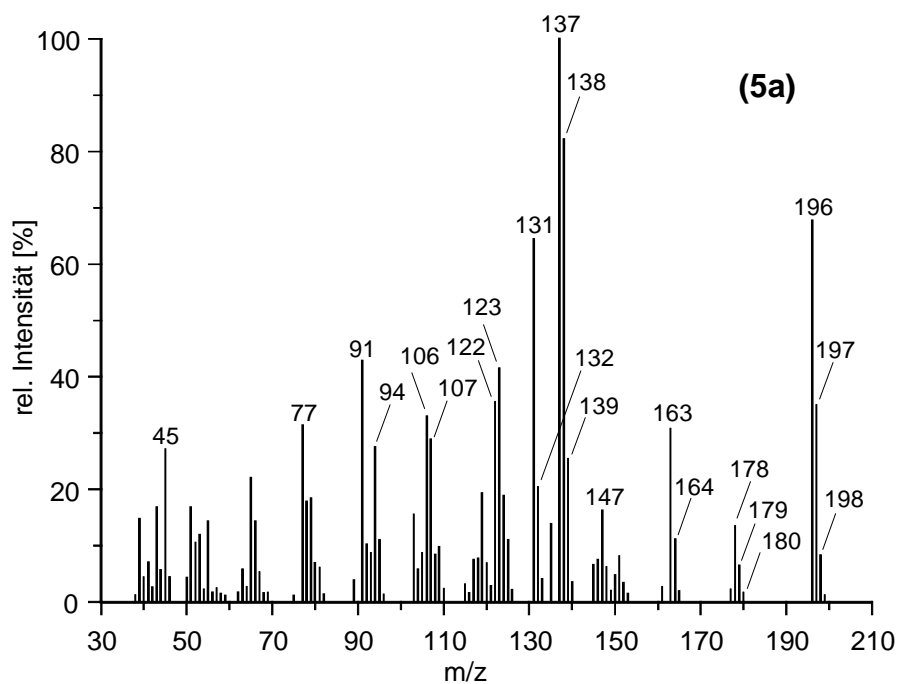


Abb. 2-31: Massenspektren zweier ^{13}C -markierter Verbindungen **(5a)** und **(6a)** nach Kultivierung mit $1\text{-}^{13}\text{C-D}(+)\text{-Glucose}$ als C-Quelle

Da die Konzentrationen ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) für eine Anreicherung mittels präparativer Gaschromatographie und anschließende Strukturaufklärung durch NMR nicht ausreichten, wurden die Extrakte mit unterschiedlichen Reagenzien derivatisiert, um die Identifizierung zu erleichtern:

- Methylierung mit Diazomethan
- Silylierung mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)
- Acetylierung mit Acetanhydrid / Essigsäure

Eine Methylierung der Substanzen mit Diazomethan war nicht möglich; die Anwesenheit einer freien Carboxylfunktion konnte somit ausgeschlossen werden.

Durch Silylierung und Acetylierung konnten beide Verbindungen derivatisiert werden. Die zugehörigen MS-Spektren (**Abb. 5-3** und **5-4**) lieferten folgende zusätzlichen Hinweise:

Durch Silylierung erhöhte sich die Molekülmasse um 144, durch Acetylierung um 84 Einheiten, woraus auf jeweils zwei Hydroxygruppen geschlossen werden konnte. Die MS-Fragmentierung der acetylierten Verbindungen lieferte jeweils eine für aromatische Hydroxygruppen typische Abspaltung von Keten (-42) und einen für aliphatische Hydroxygruppen typischen Verlust von Essigsäure (-60). Die beiden Hydroxygruppen stehen jeweils nicht in direkter Nachbarschaft zueinander, da sonst nach Silylierung ein deutlicher Peak bei m/z 147 durch Methylabspaltung aus Hexamethyldisiloxan (Kondensationsprodukt aus zwei Trimethylsilanol-Molekülen) erkennbar sein müsste. Die Bildung der Hauptfragmente mit m/z 137 und m/z 138 sowie die Wasserabspaltung verlaufen analog zu den underivatisierten Verbindungen.

Als primäre Fragmentierung erfolgt die Spaltung der C-C-Bindung in benzyllischer Stellung, die das Fragmention mit m/z 137 liefert. Aus einer McLafferty-Umlagerung [42,43] unter Abspaltung des Neutralteilchens $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (**Abb. 2-32**) resultiert als zweites Hauptfragment m/z 138.

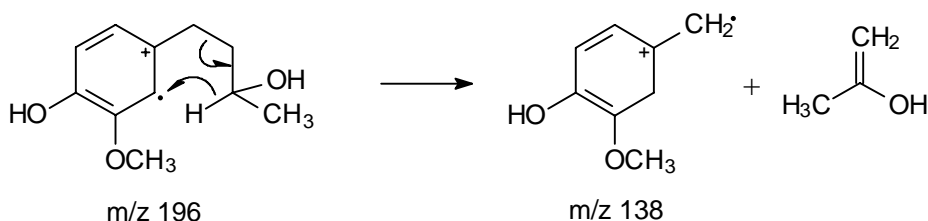
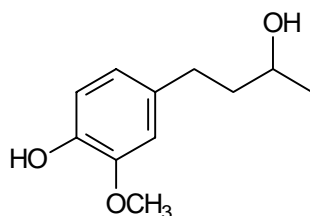


Abb. 2-32: McLafferty-Umlagerung unter Abspaltung des Neutralteilchens C_3H_6O

Daneben entsteht durch Abspaltung der zum Aromaten γ -ständigen Hydroxygruppe das Fragment $m/z\ 178$ mit einer isolierten Doppelbindung, die sich aber im MS schnell zu einer konjugierten Doppelbindung umlagern kann.

Bei den beiden Verbindungen handelt es sich damit wahrscheinlich um Zingerol (**Abb. 2-33**) sowie ein zugehöriges Positionsisomer.



Zingerol

4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-butan-2-ol
 CAS: 39728-80-8
 MG: 196; $C_{11}H_{16}O_3$

Abb. 2-33: Zingerol als weiterer Sekundärmetabolit in Kulturen von
N. niveo-tomentosa

Die Bildung von Zingerol lässt sich ausgehend vom Himbeeralkohol durch eine zweite Hydroxylierung am Ring und anschließende Methylierung erklären. Derartige Reaktionen sind bereits für andere Basidiomyceten beschrieben [47,48]. Offensichtlich bleibt der Sekundärmetabolismus in *Nidula niveo-tomentosa* nicht auf der Stufe des Himbeerketons bzw. Himbeeralkohols stehen. Im Anschluss an die zweite Hydroxylierung des Aromaten ist auch eine Polymerisation zu höhermolekularen Verbindungen denkbar.

2.3.4 Schlüsselenzyme

Art und Herkunft der Bausteine für die Biosynthese von Himbeerketon und Himbeeralkohol in *Nidula niveo-tomentosa* konnten im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Ergänzend hierzu sollten Informationen über die beteiligten Schlüsselenzyme gewonnen werden.

2.3.4.1 Zusatz intermediärer β -Keto- und β -Hydroxycarbonsäuren

Als Intermediate kommen in dem von BÖKER [26] aufgestellten hypothetischen Biosyntheschema die in **Abbildung 2-34** dargestellten β -Keto- und β -Hydroxycarbonsäuren vor. Diese vier Verbindungen sind aus natürlichen Quellen nicht oder kaum verfügbar, eignen sich also nicht als Precursoren für eine biotechnologische Produktion von Himbeerketon. Deren Precursorwirkung würde aber wichtige Hinweise über die an der Biosynthese beteiligten Enzyme liefern.

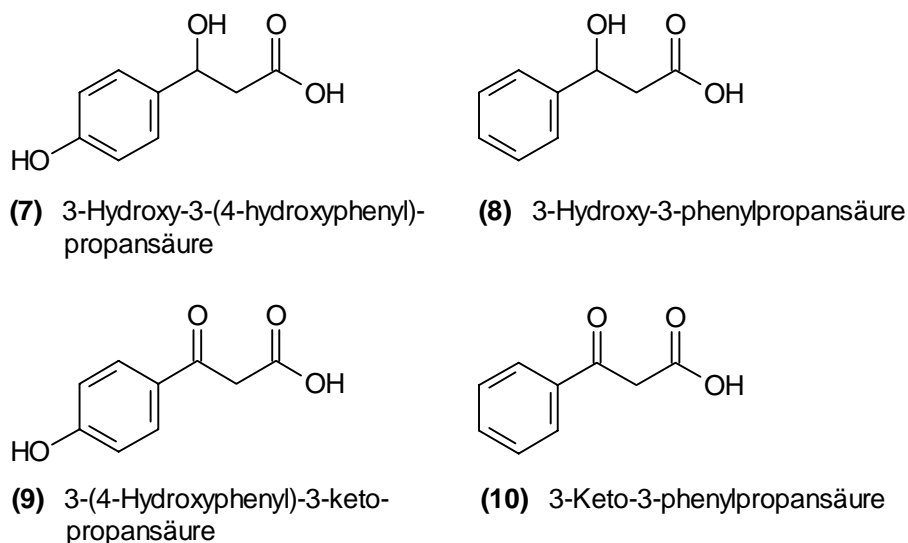


Abb. 2-34: Propansäuren als Intermediate bei der Biosynthese von Himbeerketon in *N. niveo-tomentosa*

Exemplarisch wurden die Verbindungen (8) und (10) in Form ihrer Ethylester als Precursoren eingesetzt. (8) wurde wie in 4.6.4 beschrieben synthetisiert.

Es wurde keine Umsetzung der beiden Verbindungen zu Himbeerketon oder Himbeeralkohol beobachtet. Ein geringer Anteil wurde zu Acetophenon abgebaut.

2.3.4.2 Umsetzung von Precursoren mit Enzymrohextrakt

Um die Wirkung von Precursoren unabhängig von ihrer Toxizität untersuchen zu können, wurden verschiedene Enzymrohextrakte hergestellt; auf eine aufwendige Aufreinigung der Extrakte wurde dabei verzichtet (**4.2.5**).

Als Precursoren wurden L-Phenylalanin, Hippursäure, Benzoessäure, sowie die Ethylester der Benzoylessigsäure und 3-Hydroxy-3-phenylpropansäure eingesetzt. Die Bildung flüchtiger Metabolite war bei diesen Umsetzungen nicht zu beobachten.

2.3.5 Versuche zur Steigerung der Produktivität

L-Phenylalanin und Hippursäure haben sich als geeignete Precursoren für die Biosynthese von Himbeerketon und Himbeeralkohol erwiesen. Die Produktausbeuten waren jedoch durch Erhöhung der Precursorkonzentration nicht beliebig steigerbar. Daher wurden zwei weitere Versuche zur Steigerung der Produktivität unternommen.

2.3.5.1 Induktion des Sekundärmetabolismus durch Sauerstoff-Mangel

BÖKER hatte seinen Kulturen Wasserstoffperoxid zugesetzt, welches durch pilzeigene Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt wird. Er wollte damit die Sauerstoffversorgung sicherstellen und einen Gärungsstoffwechsel vermeiden, konnte jedoch keinen Einfluss auf die Produktivität oder das Verhältnis von Himbeerketon zu Himbeeralkohol feststellen [26]. ANKE beobachtete bei Basidiomyceten sogar eine Induktion des Sekundärmetabolismus unter Sauerstoffmangelbedingungen [49]. In weiteren Experimenten wurde diese Hypothese untersucht.

Die Kultivierung erfolgte in 200- bzw. 300-mL-Erlenmeyerkolben mit Schliff. Die Kolben wurden mit einem Glasstopfen oder mit Watte verschlossen und entweder direkt oder nach 24stündiger Ruhephase in einen Schüttler gestellt.

Da das Wachstum der einzelnen Kulturen unter den gewählten Bedingungen sehr unterschiedlich verlief, wurden die Ausbeuten an Himbeerketon und Himbeeralkohol zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf die gebildete Trockenmasse normiert (**Abb. 2-35**).

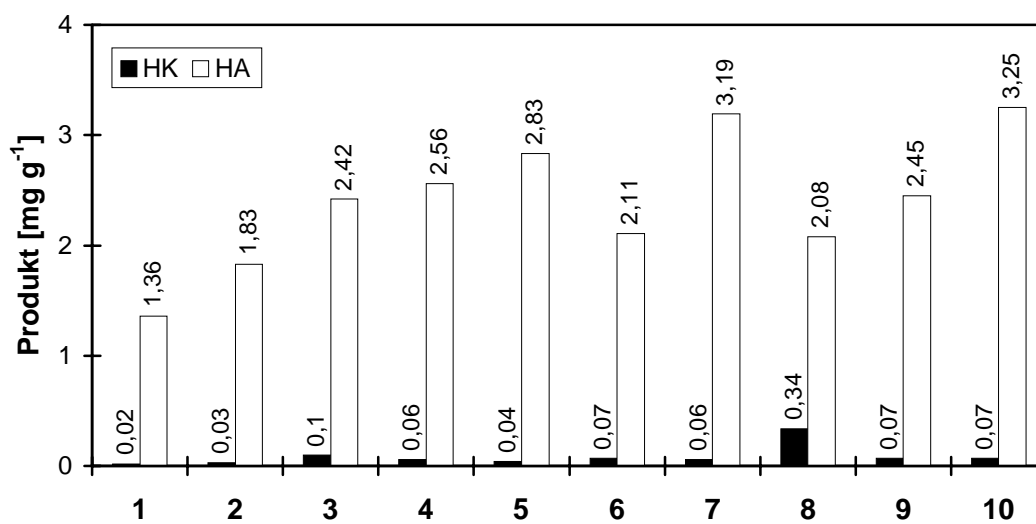


Abb. 2-35: Himbeerketon- und Himbeeralkohol ausbeuten, normiert auf Trockenmasse (1-5 in 300 mL Erlenmeyerkolben, 6-10 in 200 mL Erlenmeyerkolben, 1, 3, 6 und 8 jeweils 24 h ohne Agitation, 2 und 7 ohne Agitation, 3, 4, 8 und 9 dicht verschlossen, 5 und 10 „normale“ Kultivierung)

In den **Abbildungen 2-36 und 2-37** sind die Ergebnisse der Einzelversuche einander gegenübergestellt. Dabei wurden die Konzentrationen der sechs Hauptmetabolite, ausgenommen Himbeeralkohol, aufgetragen. Neben den bereits erwähnten Zingerolen (**2.3.3.5**) konnten die dem Himbeerketon und dem Zingeron entsprechenden ungesättigten Verbindungen 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on und 4-(4-Hydroxy-3-methoxy)-3-buten-2-on identifiziert werden.

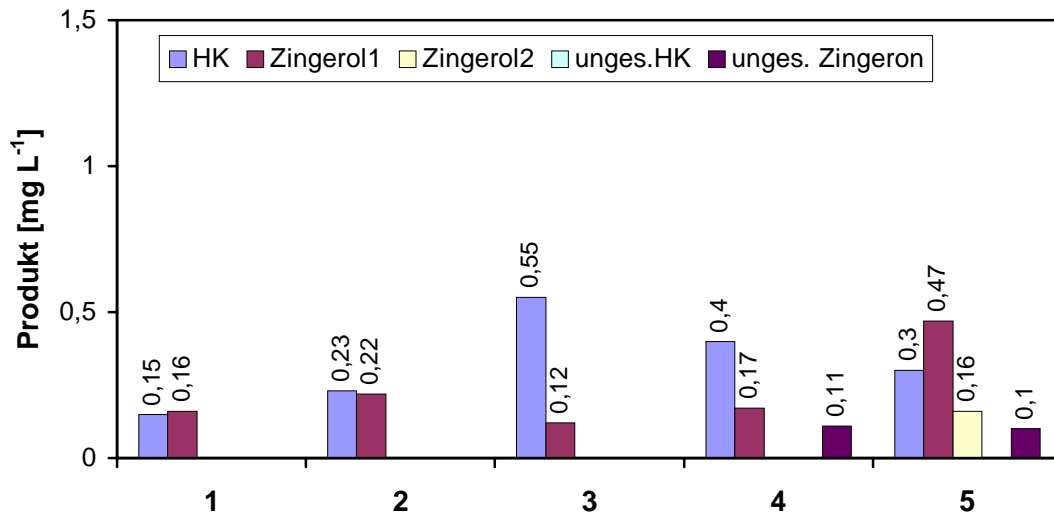


Abb. 2-36: Hauptmetabolite nach Kultivierung in 300 mL-Erlenmeyerkolben unter Sauerstoffmangelbedingungen (Legende s. Abb. 2-35)

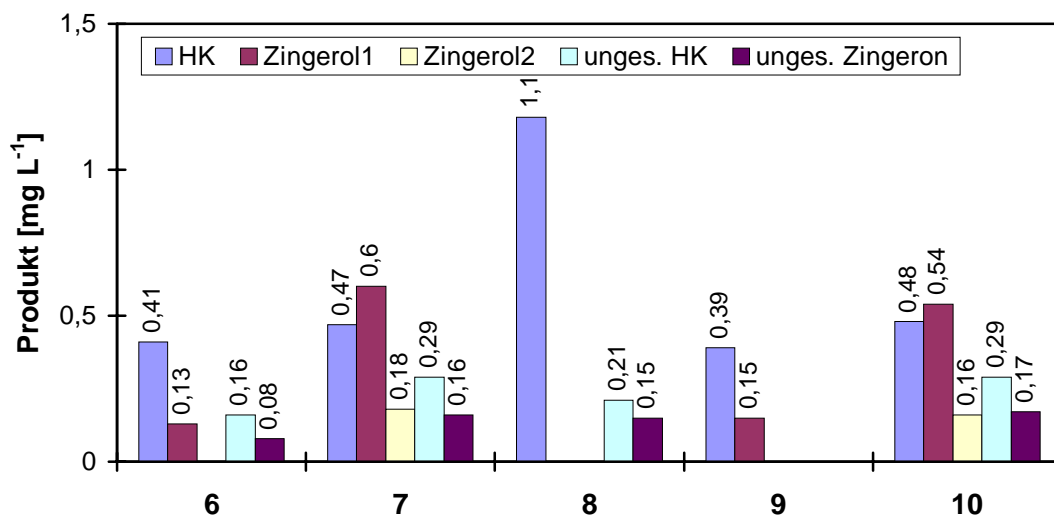


Abb. 2-37: Hauptmetabolite nach Kultivierung in 200 mL-Erlenmeyerkolben unter Sauerstoffmangelbedingungen (Legende s. Abb. 2-35)

Die Kulturen in 200 mL-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen, die erst nach 24 h in den Schüttler gestellt wurden (Versuch Nr. 8), wiesen besonders hohe Konzentrationen an Himbeerketon auf. Das Verhältnis von Himbeeralkohol zu Himbeerketon war deutlich zu Gunsten des Himbeerketons verschoben.

2.3.5.2 Kultivierung in Leatham-Medium

Für die Kultivierung von Basidiomyceten mit hohen Nährstoffansprüchen wie z. B. *Lentinus edodes* hat sich das voll-synthetische Leatham-Medium bewährt [50,51]. Das Wachstum von *Nidula niveo-tomentosa* in diesem Medium war jedoch sehr gering. Flüchtige Metabolite wurden nur in Spuren nachgewiesen. Die Bildung von Himbeerketon oder Himbeeralkohol wurde nicht beobachtet.

2.4 Aromaextrakte aus Lebensmitteln

Mit Hilfe des AED ist es möglich, neben Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel auch „exotische“ Elemente zu detektieren. Im Hinblick auf das Vorkommen einer Vielzahl schwefelhaltiger Aromastoffe in Nahrungsmitteln und die Vergesellschaftung von Schwefel und Selen in der Natur wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Lebensmittel (Knoblauch, Brokkoli, Pfifferlinge, Meerrettich, Radieschen) auf die Anwesenheit von analogen selenhaltigen Verbindungen untersucht.

Beispielhaft sind hier die Resultate für Knoblauch (*Allium sativum*), der mit ca. 6 µg pro 100 g [52] einen relativ hohen Gesamtselengehalt aufweist, wiedergegeben.

Eingesetzt wurde Knoblauch aus Deutschland und Spanien, der auf unterschiedliche Arten extrahiert wurde (4.3.1). Erwartungsgemäß waren zahlreiche schwefelhaltige Komponenten wie Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Diallyldisulfid, Diallyltrisulfid und 2-Vinyl-1,3-dithiin detektierbar. In keinem der Extrakte konnten dagegen flüchtige selenhaltige Verbindungen nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Einwaage und der ermittelten Nachweisgrenze für Selen (**Tab. 2-3**) wären Gehalte von ≥ 15 ng Selen pro Einzelkomponente und kg nachweisbar gewesen.

Zur Validierung des Verfahrens wurden Wiederfindungsversuche mit Dimethyldiselenid durchgeführt. Bei Dotierung mit 120 mg L⁻¹ Wasser wurden Wiederfindungsraten von 98 % bestimmt (4.3.1). Um mögliche Matrixeinfüsse zu

berücksichtigen, wurde außerdem für die Extraktion der Knoblauchmatrix mit Pentan/Diethylether eine Wiederfindungsbestimmung mit Dimethyldiselenid durchgeführt (4.3.1).

Die **Abbildungen 2-38** und **2-39** zeigen die entsprechenden Schwefel- und Selen-Spuren eines Knoblauchextraktes und des Knoblauchextraktes nach Zusatz von Dimethyldiselenid.

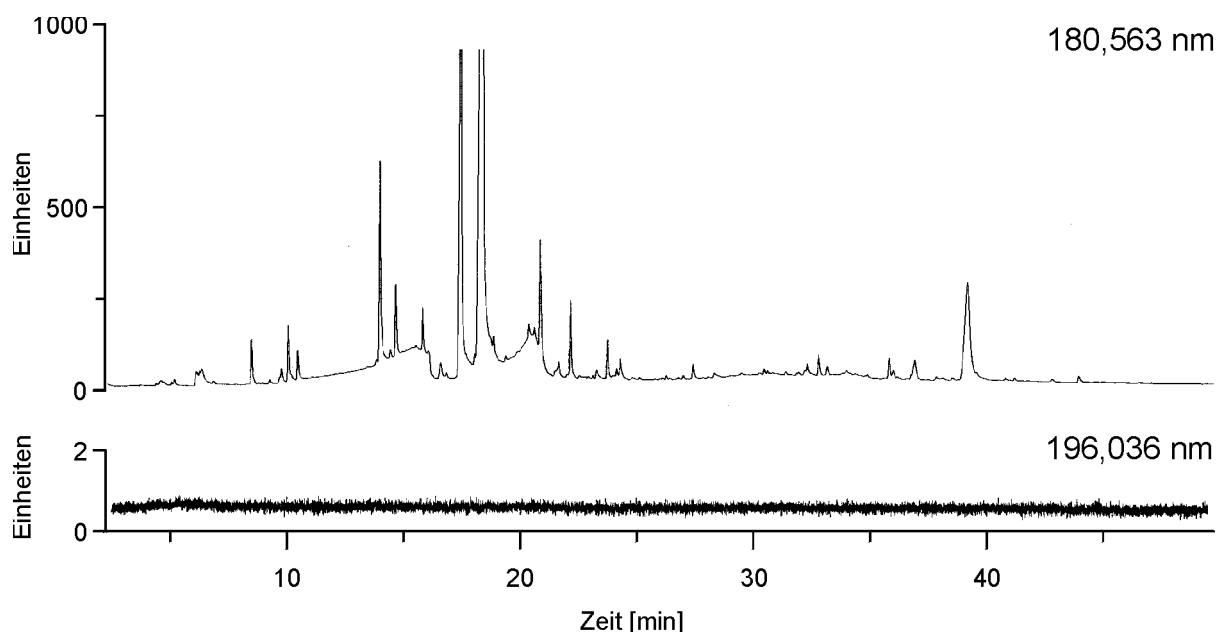


Abb. 2-38: GC-AED-Chromatogramme eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Knoblauch, S-Spur (180,563 nm) und Se-Spur (196,036 nm)

Aus dem zugesetzten Dimethyldiselenid wurden mehr als vier selenhaltige Verbindungen gebildet (**Abb. 2-39**). Anhand der GC-MS-Spektren (**Abb. 5-5** bis **5-9**) konnten die in **Tabelle 2-6** aufgeführten Verbindungen postuliert werden.

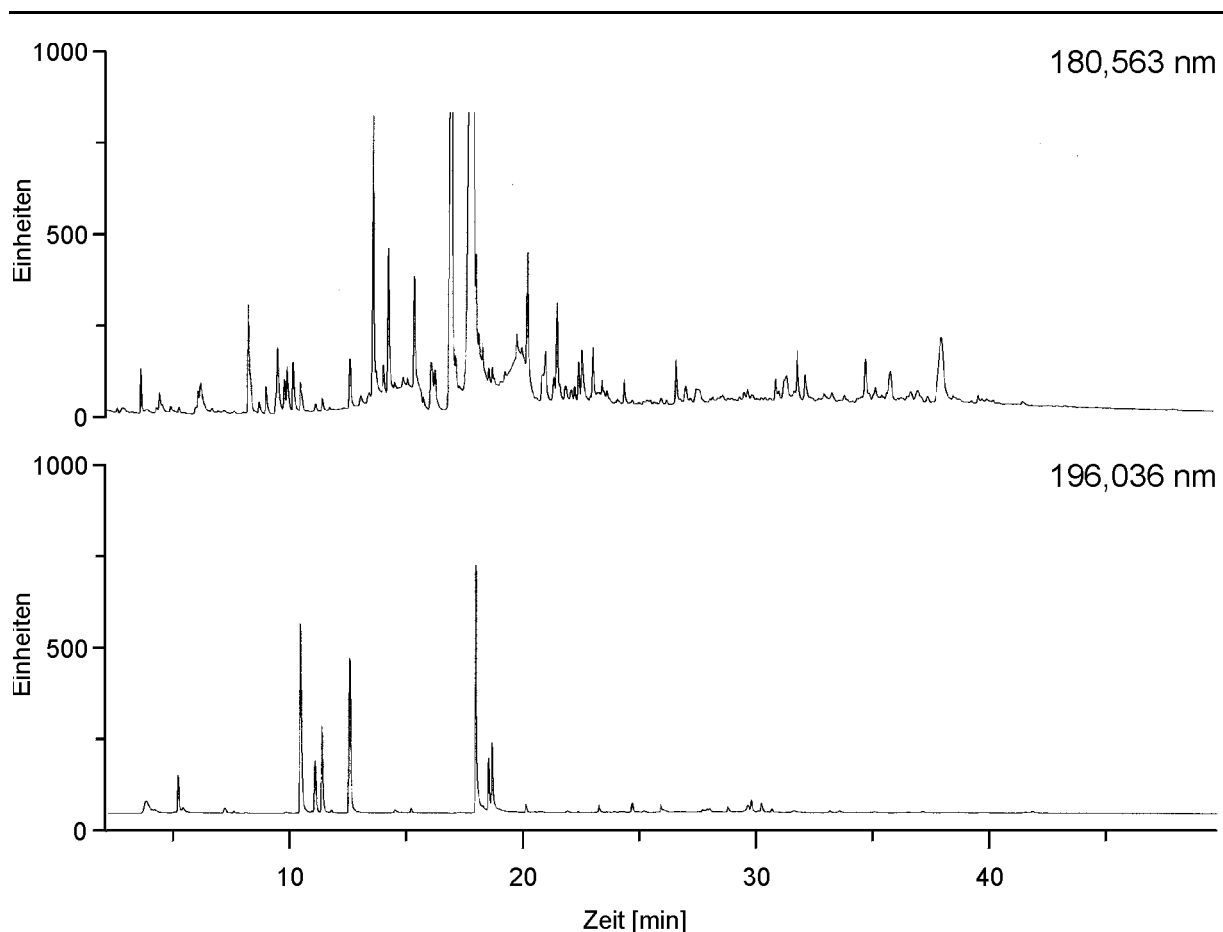


Abb. 2-39: GC-AED-Chromatogramm eines Pentan/Diethylether-Extraktes aus Knoblauch unter Zusatz von Dimethyldiselenid, S-Spur (180,563 nm) und Se-Spur (196,036 nm)

Tabelle 2-6: Selenverbindungen aus Wiederfindungsversuch von Dimethyldiselenid in Knoblauchhomogenat

Verbindung		Referenz-MS-Spektrum
Dimethyldiselenid	<chem>C[Se]C</chem>	Standard
Dimethylselenylsulfid	<chem>C[Se]S</chem>	-
Methylselenylallylsulfid	<chem>C[Se]S/C=C/C</chem>	[53]
Dimethylselenyldisulfid	<chem>C[Se]SS</chem>	-
Methylselenylallyldisulfid	<chem>C[Se]SS/C=C/C</chem>	-

Das MS-Spektrum des Dimethyldiselenids (**Abb. 5-5**) zeigt entsprechend dem schwefelhaltigen Analogon [42,43] einen intensiven Molekülpeak $M^{+\bullet}$ bei m/z 190. Durch Abspaltung einer bzw. beider Methylgruppen entstehen analog zum Dimethyldisulfid die Hauptfragmente $CH_2Se_2^+H$ mit m/z 175 und $Se_2^{+\bullet}$ mit m/z 160, jedoch auch $CHSe^{+\bullet}$ mit m/z 93 durch Verlust von H_2Se . Daneben findet sich $CH_3Se^+CH_2$ mit m/z 109 durch Verlust von HSe^\bullet (analog zum Dimethyldisulfid) und Se^+ mit m/z 80. Alle Fragmente zeigen für Selen typische Isotopenmuster (s. Anhang).

Der Molekülpeak $M^{+\bullet}$ des Dimethylselenyldisulfids (**Abb. 5-6**) wird bei m/z 142 registriert. Die Abspaltung eines Methylradikals liefert als Hauptfragmente CH_2S^+SeH bzw. CH_2Se^+SH mit m/z 127 und durch anschließenden Verlust von H_2Se bzw. H_2S die Fragmente CHS^+ mit m/z 45 und $CHSe^+$ mit m/z 93. Direkte Abspaltung von HSe^\bullet liefert dagegen $CH_3S^+CH_2$ mit m/z 61. Der Verlust beider Methylgruppen führt entsprechend dem Dimethyldisulfid und dem Dimethyldiselenid zu SSe^+ mit m/z 112 und Se^+ mit m/z 80.

Methylselenylallylsulfid (**Abb. 5-7**) zeigt einen intensiven Molekülpeak $M^{+\bullet}$ bei m/z 168. Das Hauptfragment $CH_2CHCH_2S^+$ mit m/z 73 entsteht durch Spaltung der Se-S-Bindung. Daneben entstehen analog zum Dimethylselenyldisulfid unter Verlust einer oder beider Alkylgruppen CH_2Se^+SH bzw. CH_2SSe^+H mit m/z 127 und SSe^+ mit m/z 112. Die Abspaltung von H_2Se aus CH_2Se^+SH liefert wiederum CHS^+ mit m/z 45, die Abspaltung von H_2S aus CH_2SSe^+H dagegen $CHSe^+$ mit m/z 93.

Dimethylselenyldisulfid (**Abb. 5-8**) liefert einen intensiven Molekülpeak $M^{+\bullet}$ mit m/z 174. Das Hauptfragment CHS^+ mit m/z 45 entsteht durch Spaltung der Se-S-Bindung unter Bildung des Fragments CH_2S^+SH mit m/z 79 und anschließendem Verlust von H_2S . Analog dazu entstehen CH_2Se^+SH mit m/z 127 und $CHSe^+$ mit m/z 93. Durch Abspaltung eines Methylradikals wird das Fragment CH_2SSe^+H mit m/z 159 gebildet. Daneben entsteht wiederum $SeS^{+\bullet}$ mit m/z 112.

Methylselenylallyldisulfid (**Abb. 5-9**) zeigt einen intensiven Molekülpeak $M^{+\bullet}$ bei m/z 200. Als Hauptfragment wird $CH_2CHCH_2S^+$ mit m/z 73 gebildet. Durch Eliminierung von S_2 entsteht $CH_3Se^+CH_2CHCH_2$ mit m/z 136. Daneben finden sich $CH_2CHCH_2SS^+$ mit m/z 105 und $CHSe^+$ mit m/z 93 sowie CHS^+ mit m/z 45.

3 Diskussion

3.1 Gaschromatographie-Atomemissionsdetektion

Die Kopplung der Gaschromatographie mit einem Atomemissionsdetektor, kurz GC-AED, (**Abb. 1-1**) ermöglicht eine spezifische und z. T. simultane Detektion fast aller Elemente des Periodensystems sowie einiger stabiler Isotope [7-14]. Damit bietet der AED entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen Detektoren wie NPD, FPD oder ECD.

Die selektive Bestimmung stabiler Isotope wie ^2H , ^{13}C , ^{15}N ermöglicht die Untersuchung und Aufklärung von katabolen und anabolen Stoffwechselwegen sowie von chemischen Reaktionsverläufen.

3.1.1 Funktionsprinzip

In einem mikrowelleninduzierten Heliumplasma werden die Analyten bei Temperaturen von ca. 2000 K atomisiert und die entstandenen Atome angeregt. Beim Übergang der Atome in den elektronischen Grundzustand wird Energie in Form von Licht frei. Im Spektrometer wird das emittierte Licht an einem holographischen Gitter in seine Spektrallinien zerlegt und auf ein bewegliches Photodiodenarray (PDA) gelenkt. Das PDA besteht aus 512 Dioden, auf die in Abhängigkeit vom Wellenlängenbereich 0,2 bis 0,05 nm entfallen [59]. Es wird also im Wellenlängenbereich von 171 bis 837 nm jeweils ein Ausschnitt von 25-40 nm erfasst. Das Spektrometer wird kontinuierlich mit Stickstoff gespült, um einen Verlust an Empfindlichkeit durch Feuchtigkeit und Sauerstoff zu vermeiden.

3.1.2 Vorteile des AED im Vergleich zu anderen Detektoren

3.1.2.1 Simultane Multielement-Bestimmung

Der AED bietet die Möglichkeit, mehrere Elemente simultan zu bestimmen. Dafür müssen jedoch folgende Bedingungen erfüllt sein:

- die Atomemissionswellenlängen der verschiedenen Elemente liegen nahe genug, d. h. in einem Wellenlängenbereich von etwa 25-40 nm, beieinander und
- zur Bestimmung der Elemente werden die gleichen Reaktantgase benötigt.

Für jedes Element existiert ein sogenanntes „Rezept“, in dem die einzelnen Dioden für die Elementbestimmung, die Untergrundkorrektur sowie die Reaktantgase und der Make-up-Fluss enthalten sind. Die Regulierung der Reaktantgase erfolgt über die Einstellung der Gasvordrucke, der Make-up-Fluss kann am AED über ein Rückdruckventil geregelt werden. Simultan bestimmbare Elemente sind vom Hersteller bereits zu Gruppen zusammengefasst.

Die simultane Multielement-Bestimmung bietet sich zur Detektion der verschiedensten heteroatomhaltigen Verbindungen an. So nutzten beispielsweise LIU *et al.* die GC-AED-Kopplung zur simultanen Bestimmung von Organozinn-, Organoblei- und Organoquecksilberverbindungen in Umweltproben [54]. COOK *et al.* [55] und LINKERHÄGNER und STAN [58] setzten den AED für den Nachweis von Pestiziden in pflanzlichen Lebensmitteln ein. Dabei bietet der AED durch die simultane Bestimmung von Kohlenstoff und Chlor bzw. Schwefel, Stickstoff und Phosphor eine gute Alternative zur herkömmlichen Detektion mittels ECD und NPD. Polychlorierte Biphenyle und schwefelhaltige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PASHs oder Thiaarene) sind weitere Beispiele für einen sinnvollen Einsatz des AED. Untersuchungen dazu wurden von BECKER *et al.* [56] und PEDERSEN-BJERGAARD *et al.* [57] durchgeführt.

Für die eigenen Untersuchungen wurden hauptsächlich die simultane Bestimmung von Kohlenstoff und Stickstoff, Kohlenstoff, Chlor und Brom sowie Schwefel und

Selen genutzt. So konnten Methylantranilat in Kulturmedienextrakten von *Pycnoporus cinnabarinus* (2.2), Organohalogenverbindungen in Kulturen von *Bjerkandera adusta* (2.1.3) sowie Schwefel- und Selenverbindungen in Knoblauch-homogenat (2.4) spezifisch und schnell detektiert werden.

3.1.2.2 Compound independent calibration

Eine GC-AED-Messung mit nachgeschalteter „compound independent calibration“ (CIC) liefert die ungefähre Elementarzusammensetzung chemischer Verbindungen. Die Genauigkeit einer Mikroanalyse wird dabei nicht erreicht, die benötigten Probemengen sind jedoch wesentlich geringer.

Diese Kalibrationsmethode beruht auf der Annahme, dass der Response für ein Element unabhängig von der Struktur des Gesamtmoleküls ist. Zur Kalibration kann somit jede beliebige Verbindung eingesetzt werden, die das betreffende Element enthält. Zur Ermittlung von Elementverhältnissen bei Sulfiden aus Knoblauch-extrakten wurde die CIC bereits erfolgreich eingesetzt [10].

Voraussetzung für eine CIC ist die vollständige Atomisierung des Analyten im Heliumplasma. Abhängig von Substanz und zu bestimmendem Element ist dies jedoch nicht immer der Fall. WEBSTER und COOKE untersuchten den Response für Chlor, Kohlenstoff und Sauerstoff in Phenolen und kamen zu dem Ergebnis, dass der Response für Chlor unabhängig von der Molekülstruktur ist, sowohl für Kohlenstoff als auch für Sauerstoff allerdings eine deutliche Abhängigkeit von der Bindungsform besteht [27]. Dieser Einfluss wurde besonders beim Vergleich der Responsefaktoren von sauerstoffhaltigen und sauerstofffreien Verbindungen deutlich. Sie führten dies auf die Bildung von Kohlenmonoxid im Plasma zurück, wobei die Bestimmung der stabilen Kohlenstoff- und Sauerstoffisotope mittels GC-AED gerade auf diesem Phänomen beruht.

HUANG YIERU *et al.* untersuchten den Einfluss der Molekülstruktur auf die Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Chlor und Brom. Sie kamen zu dem Schluss, dass Responsefaktoren innerhalb von homologen Reihen unabhängig von

der Molekülstruktur sind [28]. Dies gilt innerhalb gewisser Grenzen auch für die meisten anderen Detektionsarten, da chemisch und physikalisch ähnliche Verbindungen im allgemeinen auch vergleichbare Responsefaktoren besitzen [60].

BOS und BARNETT betrachteten den Einfluss der Molekülstruktur auf die Bestimmung von Selen, wobei sie die drei Atomemissionslinien des Selens bei 196,09 nm, 203,98 nm und 216,42 nm verwendeten [29]. Die Genauigkeit der Bestimmung des Se:C-Verhältnisses lag bei $\pm 10\%$, die Auswertung bei 196,09 nm wurde jedoch durch die Bildung von SeO und das Auftreten einer Molekülbande beeinträchtigt.

Für Sauerstoff und Stickstoff wurde die Abhängigkeit der Responsefaktoren von der Molekülstruktur anhand von Standardsubstanzen untersucht. Die Responsefaktoren der vier ausgewählten stickstoffhaltigen Verbindungen Methylantranilat, Ethylnicotinat, Trimethylpyrazin und Benzoxazol zeigten gute Übereinstimmungen, eine Abhängigkeit von der Bindungsform war nicht zu erkennen (**2.1.1**). Die Bestimmung des Sauerstoffs bereitete dagegen größere Schwierigkeiten. Für Sauerstoffmessungen ist grundsätzlich eine zusätzliche Injektion nötig, da hier ein spezielles Reaktantgasgemisch aus Wasserstoff und Methan/Stickstoff (10/90, v/v) eingesetzt wird. Die Nachweisgrenze war mit 400 pg s^{-1} deutlich schlechter als vom Hersteller angegeben (**Tab. 2-3**). Die Kalibriergeraden für (-)- β -Citronellol und 1,8-Cineol zeigten deutliche Unterschiede sowohl im Hinblick auf die Empfindlichkeit als auch im Hinblick auf die Responsefaktoren für Sauerstoff.

Für die Untersuchung der Organohalogenverbindungen in Kulturen von *Bjerkandera adusta* erwies sich die simultane Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Chlor und Brom und eine anschließende CIC als sehr nützlich (**2.1.3**). In Kulturextrakten konnten mittels GC-AED simultan verschiedene *de novo* synthetisierte Organohalogenverbindungen detektiert werden (**Abb. 2-3**). Die Berechnung der ungefähren Elementverhältnisse anhand der CIC bietet insbesondere dann große Vorteile, wenn in einem Molekül verschiedene Halogene vorhanden sind. In diesen Fällen ist die Auswertung von MS-Spektren häufig mit großen Schwierigkeiten behaftet und z. T. unmöglich.

Der Anteil an Kohlenstoff wird bei der CIC automatisch auf eins normiert und die Anteile der übrigen Elemente relativ dazu angegeben (**Tab. 4-8**). Zur Berechnung der Summenformeln konnte im vorliegenden Fall von jeweils acht Kohlenstoffatomen im Molekül ausgegangen werden, da der untersuchte Weißfäulepilz bekanntermaßen Anisylderivate produziert.

Die Abweichungen der berechneten Elementverhältnisse von den Summenformeln lagen für Wasserstoff bei 8-18 % (Ausnahme: 3,5-Dichlor-4-methoxybenzaldehyd), für Chlor und Brom bei 20-45 % (Ausnahme: 3-Brom-4-methoxybenzylalkohol). Die Abweichungen für die Sauerstoffanteile waren hingegen durchweg größer. Statt zwei Atomen wurden zu kleine Werte zwischen 0,3 und 1 bestimmt, was im Fall des 3,5-Dibrom-4-methoxybenzaldehyds einer Abweichung von 85 % entsprach. Die Problematik der Bestimmung von Sauerstoff wurde bereits bei den vorhergehenden Untersuchungen über die Abhängigkeit der Responsefaktoren von der Molekülstruktur deutlich. Offensichtlich kann hier nicht von einer vollständigen Atomisierung ausgegangen werden, was eine Bestimmung des Sauerstoffanteils mittels CIC nahezu ausschließt.

Am Beispiel der hier diskutierten Organohalogenverbindungen konnte jedoch die prinzipiell sehr gute Eignung der GC-AED mit CIC zur Identifikation mikrobieller Sekundärmetabolite unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Daten gezeigt werden.

3.1.2.3 Bestimmung stabiler Isotope

Die Erfassung von stabilen Isotopen wie ^2H , ^{13}C und ^{15}N kann für die Aufklärung von Metabolismen und chemischen Reaktionsverläufen genutzt werden. Damit bietet die GC-AED eine leistungsfähige Alternative zum Einsatz radioaktiv markierter Substanzen.

Obwohl sich die Atomemissionslinien stabiler Isotope meist nur sehr wenig voneinander unterscheiden, ist eine simultane Bestimmung mit ausreichender Genauigkeit möglich. Die Untergrundkorrektur ist bereits so voreingestellt, dass natürliche Gehalte der schwereren Isotope unterdrückt werden. Falls ein großer Überschuss des leichteren Isotops vorliegt, ist häufig allerdings zusätzlich eine

nachträgliche manuelle Untergrundkorrektur notwendig. Damit ist die simultane Bestimmung von $^1\text{H}/^2\text{H}$ bzw. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ mittels AED auch dann noch möglich, wenn die massenspektrometrische Detektion aufgrund von Überlappungen von markierten und unmarkierten Peaks die Erkennung erschwert bzw. unmöglich macht.

Bei der Untersuchung der Himbeerketon-Biosynthese wurde die simultane Bestimmung von $^1\text{H}/^2\text{H}$ bzw. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ erfolgreich angewendet (**2.3.1, 2.3.2.3, 2.3.3.4**). Trotz des Überschusses an entsprechenden unmarkierten Substanzen war die Identifizierung der meist nur einfach markierten Substanzen unproblematisch. Anhand der Peakflächen konnte der Anteil an markierten Atomen im Molekül berechnet werden.

3.1.3 Nachteile des AED im Vergleich zu anderen Detektoren

Nach Herstellerangaben differieren die Nachweisgrenzen je nach Element zwischen $0,5 \text{ pg s}^{-1}$ (Kohlenstoff) und 50 pg s^{-1} (Sauerstoff). Die in dieser Arbeit bestimmten Nachweisgrenzen (**Tab. 2-3**) weisen noch größere Unterschiede auf. Sie lagen zwischen $0,3 \text{ pg s}^{-1}$ für Selen (196,036 nm) und 600 pg s^{-1} für Stickstoff (174,311 nm). Da der AED nicht zur Spurenanalytik, sondern primär zum Screening von Aromaextrakten und zur Aufklärung von Biosynthesewegen eingesetzt werden sollte, wurde auf eine weitere z. T. sehr aufwendige Optimierung der Detektionsparameter zur Senkung der Nachweisgrenze verzichtet.

Insbesondere der Routinebetrieb eines AED ist auf Grund des beträchtlichen Gasverbrauchs verhältnismäßig teuer. Für Plasma und Trägergas wird Helium der Qualität 6.0 bzw. bei nachfolgender Reinigung an einem Heliumgetter Helium 5.0 benötigt. Zur Spülung des Spektrometers werden ca. 65 L d^{-1} Stickstoff verbraucht. Einen weiteren Kostenfaktor stellen die Entladungsröhrchen dar, die je nach Probenbeschaffenheit alle drei bis vier Wochen gewechselt werden müssen. Der Zustand des Entladungsröhrchens beeinflusst die Empfindlichkeit der Messung entscheidend. Vor allem hochkonzentrierte und wenig aufgereinigte Proben, B-, P-

und Si-haltigen Proben sowie Säulenbluten tragen maßgeblich zur Verschmutzung des Entladungsröhrchens bei.

3.2. Aufklärung von Biosynthesewegen mit Hilfe von Precursoren

Die wichtigste Methode zur Aufklärung von Biosynthesewegen ist der Einsatz möglicher Precursoren. Im Falle der hier untersuchten Basidiomyceten kann der nicht-markierte Precursor zu Submerskulturen hinzugefügt werden. Lässt sich nach Ende der Kultivierungsdauer eine Erhöhung der Zielmetabolitkonzentration feststellen, wird der zugesetzten Verbindung eine Precursoraktivität und damit eine Beteiligung an der Biosynthese zugeschrieben.

Um die Metabolisierung des Precursors verfolgen zu können, verwendet man im zweiten Schritt spezifische isotope-markierte Verbindungen. Besondere Bedeutung haben dabei die stabilen Isotope ^2H , ^{15}N und ^{13}C sowie die radioaktiven Isotope ^3H , ^{14}C , ^{35}S und ^{32}P erlangt.

In Zusatzexperimenten tritt jedoch häufig das Problem auf, dass ein potenzieller Precursor nicht oder nur in geringem Maße für die Biosynthese genutzt wird. Im einfachsten Fall kann dies bedeuten, dass die Verbindung nicht an der Biosynthese des Zielmetaboliten beteiligt ist. Darüberhinaus sind aber noch weitere Gründe denkbar, die die Nutzung eines Precursors verhindern können [6]:

- Auf Grund des Fehlens spezifischer Transportmöglichkeiten gelangt der Precursor nicht an den Ort der Biosynthese.
- Der Precursor wird sehr viel effizienter zur Biosynthese anderer Sekundär- oder auch Primärmetabolite genutzt.
- Der Precursor ist an der Biosynthese beteiligt, hemmt aber an der Umsetzung beteiligte Enzyme.
- Im Falle von hochmarkierten Verbindungen können sogenannte „Isotopeneffekte“ auftreten, d. h. sie werden auf Grund sekundärer kinetischer Effekte schlechter bzw. langsamer metabolisiert als die unmarkierten Analoga [40,41].

Verbindungen, die sich als gute Precursoren für einen Metaboliten erwiesen haben, sind allerdings nicht zwangsläufig auch Intermediate des natürlichen

Biosyntheseweges. Nur wenn der Precursor im Organismus nachweisbar ist und aus der gleichen Vorstufe wie der eigentliche Metabolit gebildet werden kann, handelt es sich um eine fakultative Vorstufe. Dies kann durch Untersuchungen mit isolierten Enzymen bestätigt werden [6].

3.3. Biosynthese und Produktion von Methylantranilat

Der direkte Vorläufer des Methylantranilats ist die Anthranilsäure (2-Aminobenzoessäure), zu deren Methylierung höhere Pilze wie *Pycnoporus cinnabarinus* oder Hefen wie *Candida cylindracea* [61] befähigt sind. Die Bildung der Anthranilsäure ist eng mit der Biosynthese und dem Abbau des L-Tryptophans verknüpft, weshalb hierauf genauer eingegangen werden soll.

3.3.1 L-Tryptophan-Metabolismus

Während L-Tryptophan für den Menschen essenziell ist, sind Mikroorganismen und Pflanzen zu seiner Biosynthese befähigt. Gemeinsam mit den anderen aromatischen Aminosäuren wird L-Tryptophan über den Shikimat-Weg gebildet, der mit der Umsetzung von Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat zu 3-Desoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphat (DAHP) eingeleitet wird (**Abb. 3-1**). Ihr Kondensationsprodukt wird cyclisiert und durch die Bildung zweier Doppelbindungen und die Einführung eines weiteren Moleküls Phosphoenolpyruvat entsteht Chorisminsäure, die als Verzweigungsprodukt für verschiedene Reaktionswege auch zu L-Phenylalanin führt. Durch Abspaltung der Phosphoenolpyruvat-Gruppe aus Chorisminsäure und eine Aminierung entsteht Anthranilsäure. Die Kondensation mit aktiviertem Ribose-5-P liefert zwei Kohlenstoffatome für den fünfgliedrigen Tryptophanring. Der Rest der Ribosegruppe wird danach abgespalten und durch L-Serin ersetzt [34].

Der wichtigste Abbauweg des L-Tryptophans beginnt mit einer oxidativen Spaltung des Fünfrings, die durch Tryptophan-2,3-Dioxygenase (EC 1.13.11.11) katalysiert wird. Das Produkt dieser Reaktion ist L-Formylkynurenin ((S)-2-Amino-4-(2-formyl-

aminophenyl)-4-oxo-butansäure), welches zu Formiat und L-Kynurenin ((S)-2-Amino-4-(2-aminophenyl)-4-oxo-butansäure) hydrolysiert wird. Nach Hydroxylierung des L-Kynurenins wird die Seitenkette verkürzt und unter Freisetzung von L-Alanin entsteht 3-Hydroxyanthranilsäure. Dessen Metabolisierung führt im weiteren Verlauf zu Chinolinat als Ausgangsmolekül für die Biosynthese von NAD und NADP sowie zu Crotonyl-CoA und Acetyl-CoA [34].

Kynureninase katalysiert eine β,γ -Eliminierung, an welcher Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆) als Cofaktor mitwirkt. Ist dieses nur in geringen Mengen vorhanden, werden anstelle der 3-Hydroxyanthranilsäure Kynurensäure (4-Hydroxychinolin-2-carbonsäure), und Xanthurensäure (4,8-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure) gebildet. Die Umsetzung von L-Kynurenin durch Kynureninase kann auch vor der Hydroxylierung stattfinden, woraus Anthranilsäure resultiert [15,34].

L-Tryptophan hemmt die beiden ersten Enzyme seiner Biosynthese: Anthranilat-Synthase (EC 4.1.3.27) und Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18) [15].

Der L-Tryptophan-Gehalt der meisten Proteine ist gering, dementsprechend unterliegt der Abbau dieser Aminosäure einer Produkt-Induktion [33,44]. Dabei spielt L-Kynurenin eine entscheidende Rolle, da es auf alle beteiligten Enzyme induzierend wirkt.

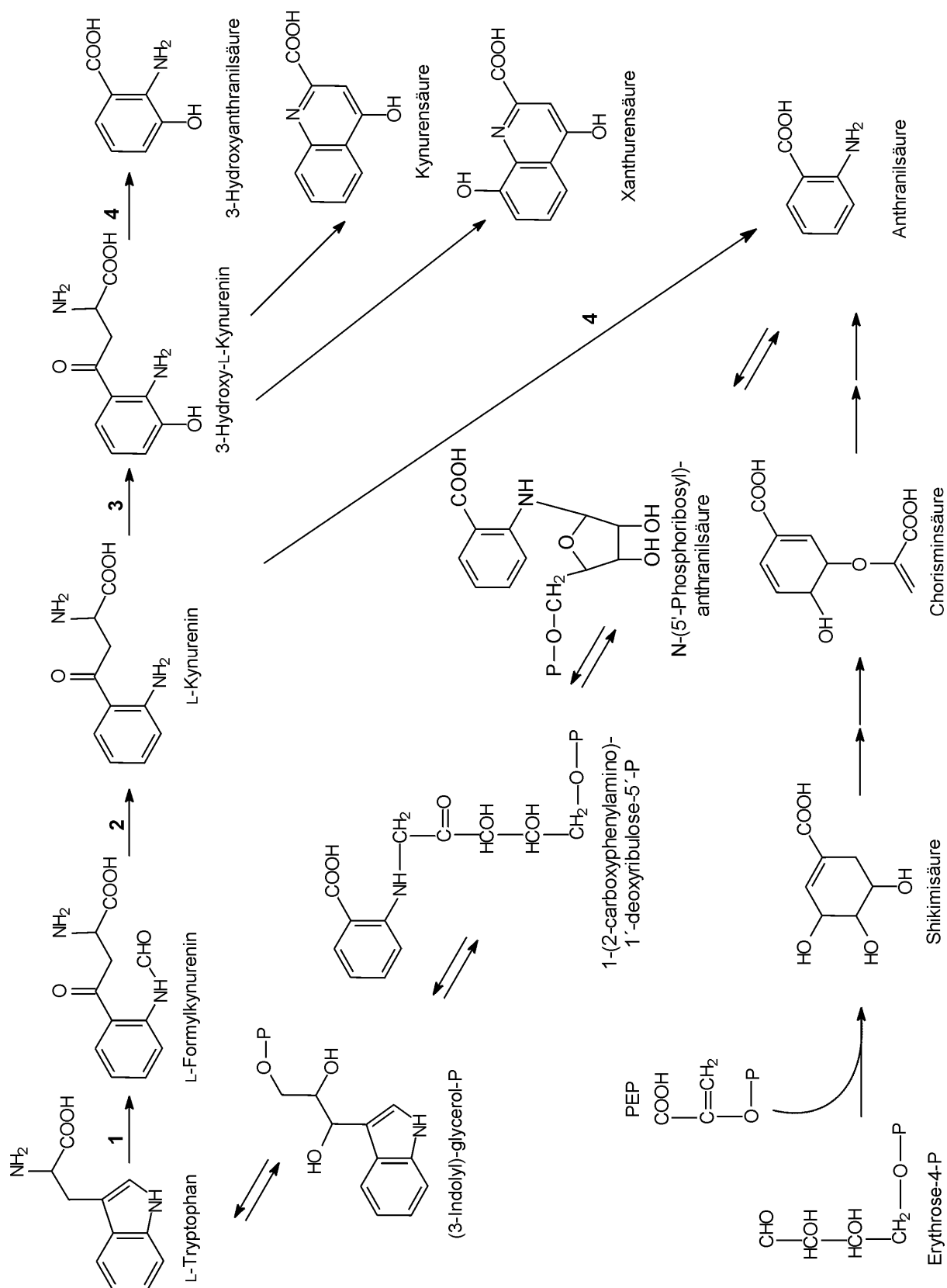


Abb. 3-1: L-Tryptophan – Anthranilsäure - Metabolismus

1 = L-Tryptophan-2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.11), 2 = Arylformamidase (EC 3.5.1.9),

3 = L-Kynurenin-3-monooxygenase (EC 1.14.13.9), 4 = L-Kynureninase (EC 3.7.1.3)

3.3.2 *De novo* Biosynthese von Methylantranilat durch den Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus*

Der Basidiomycet *Pycnoporus cinnabarinus* ist zur *de novo* Synthese von Methylantranilat befähigt. Über den genauen Ablauf der Biosynthese liegt keine Literatur vor, weshalb als Arbeitshypothese der in **Abbildung 3-1** aufgezeigte L-Tryptophan – Anthranilsäure - Metabolismus diene.

Im Hinblick auf die Bildung von Methylantranilat durch *P. cinnabarinus* erwiesen sich Maltose und Diammoniumtartrat als C- bzw. N-Quellen als optimal. Der Einsatz verschiedener Peptone resultierte dagegen in niedrigeren Gehalten an Methylantranilat [20]. In **Tabelle 3-1** sind die verschiedenen von GROSS *et al.* eingesetzten Peptone und die damit erzielten Methylantranilatkonzentrationen aufgeführt. Da Anthranilsäure ein Intermediat des L-Tryptophan-Metabolismus ist und seine Bildung Vitamin B₆-abhängig ist, wurden die Methylantranilatkonzentrationen den L-Tryptophan- und Vitamin B₆-Gehalten der Peptone gegenübergestellt. Bei den Werten handelt es sich um Herstellerangaben, die natürlichen Schwankungen

Tab. 3-1: Maximale Methylantranilatkonzentrationen in Abhängigkeit von den L-Tryptophan- und Vitamin B₆-Gehalten der N-Quelle

N-Quelle	Trp-Gehalt [%]	Vit. B ₆ -Gehalt [µg g ⁻¹]	max. Methylantranilat-Konz. [mg L ⁻¹] ^a
Diammoniumtartrat	-	-	8,0
NH ₄ Cl	-	-	4,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	2,5
KNO ₃	-	-	2,0
H ₄ H ₂ PO ₄	-	-	1,9
Casamino acids ^b	< 0,01	< 0,1	5,1
Tryptone ^b	0,71	0,6	n.n.
Yeast Extract ^b	1,36	43,2	n.n.
Biothione ^c	0,7	3,2	n.n.
Biotrypcase ^c	0,9	0,06	n.n.
Biosoyase ^c	0,7	4,0	n.n.

^a = Gross *et al.*, ^b = Difco, ^c = bioMérieux

unterliegen [62, 63].

Bei Verwendung von N-Quellen mit L-Tryptophan-Gehalten von 0,7-1,36 % und Vitamin B₆-Gehalten > 0,1 µg g⁻¹ konnte von GROSS *et al.* in den Kulturen kein Methylantranilat nachgewiesen werden (**Tab. 3-1**). Zur Deutung dieser Ergebnisse lassen sich unter Berücksichtigung des L-Tryptophan – Anthranilsäure – Metabolismus (**Abb. 3-1**) folgende Hypothesen formulieren:

- Die Mengen an L-Tryptophan reichen gerade zur Deckung des Bedarfs zur Proteinbiosynthese aus. Es erfolgt kein Abbau und somit keine intermediäre Anthranilsäurebildung.
- Die Mengen an L-Tryptophan sind ausreichend hoch, um die eigene Biosynthese zu hemmen. Auch in diesem Fall würde Anthranilsäure nicht als Intermediat gebildet.
- Der alternative Abbau von L-Tryptophan zu Anthranilsäure erfolgt nur bei Vitamin B₆-Mangel.

Zur Steigerung der Methylantranilatproduktion wurden folgende Aspekte untersucht:

- Verbesserung des Wachstums
- Zusatz von Precursoren
- Bedeutung der Laccase
- *in situ* Adsorption der Zielverbindung

3.3.3 Steigerung der Methylantranilatproduktion

3.3.3.1 Verbesserung des Wachstums

GROSS *et al.* hatten bereits auf den Einfluss von Art und Menge des Inokulums auf die Bildung von Methylantranilat hingewiesen [20]. Das beste Ergebnis (18,7 mg L⁻¹) erzielten sie bei Einsatz einer Sporensuspension zum Inokulieren der Kulturen.

Auf Grund der besseren Handhabbarkeit und des schnelleren Wachstums von Submerskulturen wurde auf den Einsatz von Sporen verzichtet und die Inokulation der Kulturen gemäß **4.2.1** durchgeführt. Da die Kulturen von *Pycnoporus*

cinnabarinus in PCI-Medium nur sehr geringes Wachstum zeigten, wurden zum Vergleich SNL-Hefe- und Sojapepton-Medium eingesetzt, die sich bereits bei anderen Basidiomyceten als gut geeignet erwiesen hatten [26,31].

Bis zum 6. Kulturtag wurde in SNL-Hefe und Sojapepton-Medium mit Trockenmassen von 4,5 bis 9,2 g L⁻¹ im Vergleich zu PCI-Medium ein um den Faktor 2-4 besseres Wachstum erreicht (**2.2.1**). Dabei ergaben sich für die beiden untersuchten Stämme signifikante Unterschiede. In den Kulturen des von GROSS *et al.* verwendeten Stammes I-937 sowie bei Verwendung des Sojapepton-Mediums wurde kein Methylantranilat nachgewiesen. Beim Stamm CBS 353.63 war die Methylantranilatkonzentration in SNL-Hefe-Medium (0,8 mg L⁻¹) gegenüber der Kultivierung in PCI-Medium (17,9 mg L⁻¹) vernachlässigbar.

Methylantranilat wird wie viele andere Sekundärmetabolite offensichtlich erst nach der aktiven Wachstumsphase gebildet, wenn die Nährstoffe weitgehend aufgebraucht sind und die akkumulierten Primärmetabolite in den Sekundärmetabolismus eingeschleust werden [3,4,64]. Trotz sehr guten Wachstums in SNL-Hefe- und Sojapepton-Medium wurde dieser Zustand bis zum 6. Kulturtag nicht erreicht. Ein verbessertes Wachstum konnte durch Erhöhung der C- und N-Gehalte erreicht werden, was jedoch nicht mit einer erhöhten Methylantranilatproduktion korrelierte. Bei Einsatz komplexer organischer N-Quellen werden dem Pilz L-Tryptophan und Vitamin B₆ zugeführt, was sich auf die Methylantranilatproduktion deutlich negativ auswirkte.

3.3.3.2 Zusatz von Precursoren

Die Verwendung der komplexen N-Quellen Hefeextrakt und Sojapepton, die jeweils ca. 1 Gew. % L-Tryptophan enthalten, hatte einen deutlich negativen Einfluss auf die Methylantranilatproduktion (**2.2.1**). Da der L-Tryptophan - Anthranilsäure – Metabolismus bezogen auf L-Tryptophan sowohl anabol als auch katabol abläuft, war eine Precursorwirkung des L-Tryptophans für die Bildung von Methylantranilat jedoch

nicht auszuschließen. In den komplexen Nährmedien war zudem Vitamin B₆ enthalten, welches den L-Tryptophan-Metabolismus ebenfalls beeinflusst.

L-Kynurenin entsteht während des L-Tryptophankatabolismus als Intermediat und wirkt induzierend auf die Enzyme, die an seiner Bildung und an seiner weiteren Metabolisierung beteiligt sind [15,34].

Das Wachstum der Kulturen war nach Zusatz von L-Tryptophan und/oder L-Kynurenin erwartungsgemäß unverändert. Die Methylantranilatkonzentrationen wurden durch Zusatz des L-Kynurenins leicht positiv beeinflusst. Der Zusatz von L-Tryptophan bzw. die Kombination von L-Tryptophan und L-Kynurenin führte dagegen zu niedrigeren Methylantranilatausbeuten.

3.3.3.3 Bedeutung der Laccase

Laccasen zählen zu den ligninolytischen Enzymen und werden von zahlreichen Pilzen, darunter v. a. Weißfäulepilze, gebildet. Über die physiologischen Funktionen der Laccasen ist bisher wenig bekannt. Unter anderem wird ihnen eine Beteiligung an der Regulation weiterer ligninolytischer Enzyme durch Produktion oxidierter Ligninmetabolite, am Schutz vor toxischen Ligninabbau-Intermediaten durch Polymerisation, an der Pigmentierung in *Aspergillus nidulans* und der Fruchtkörperbildung in *Lentinus edodes* zugeschrieben [65,66].

Die Bildung von Phenoxazinonen (**Abb. 3-2**) aus Anthranilsäure-Derivaten wird ebenfalls von Laccasen katalysiert. So entsteht in *P. cinnabarinus* durch Oxidation von 3-Hydroxyanthranilsäure vor allem Cinnabarinsäure, die für ihre antibakterielle Wirkung bekannt ist [35]. Zu den Phenoxazinonen zählen auch das Actinomycin der Streptomyceten sowie das Xanthommatin der Insekten [6].

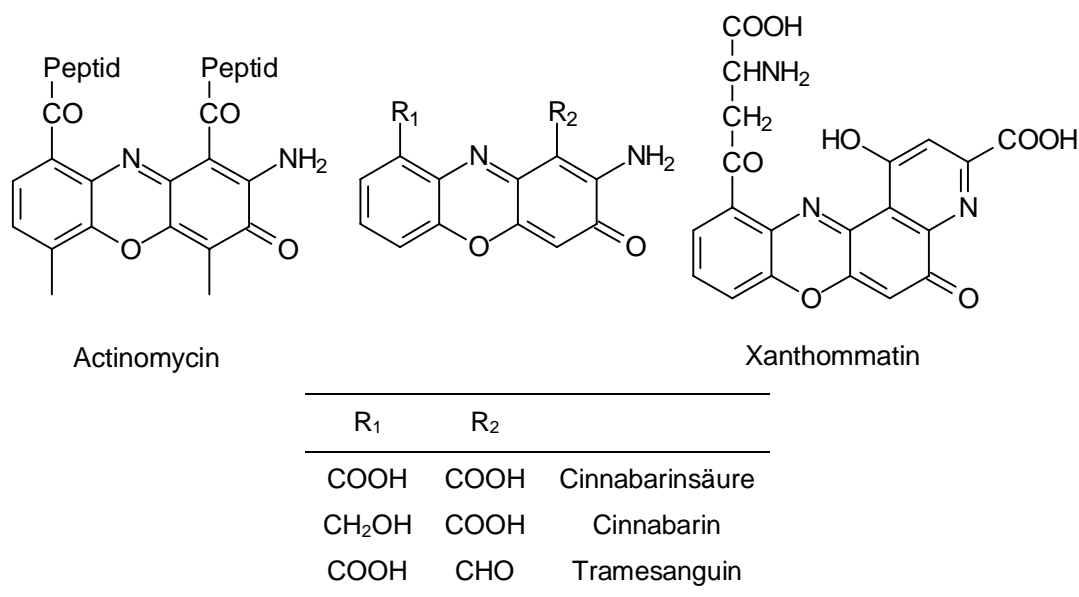


Abb. 3-2: Phenoxazinone als Kondensationsprodukte aus Anthranilsäure-Derivaten

Auf Grund der durch Laccase katalysierten Polymerisation von 3-Hydroxyanthranilsäure könnte mit einer hohen Laccaseaktivität eine Verringerung der Methylantranilatkonzentration einhergehen. Tatsächlich aber konnten in Kulturen mit besonders intensiver Orangefärbung und rotem amorphen Niederschlag die höchsten Produktkonzentrationen nachgewiesen werden [20]. Offensichtlich wird die Bildung von Anthranilsäure bzw. Methylantranilat durch die Weiterreaktion zu Phenoxazinonen angeregt. Daher wurde versucht, die Laccaseaktivität und damit die Methylantranilatkonzentration zu steigern.

Laccasen enthalten in der Regel vier Kupfer-Zentralatome, weshalb sie auch als „blue copper oxidases“ bezeichnet werden [65]. Das als N-Quelle eingesetzte Diammoniumtartrat kann mehrwertige Metall-Ionen komplexieren und bildet mit Kupfer-(II)-Ionen einen Bis-(tartrato)-cuprat(II)-Komplex (**Abb. 3-3**) [67]. Die Komplexierung der Kupfer-Ionen könnte zu einer verminderten Laccaseaktivität führen. Durch Ersatz des Diammoniumtartrats durch Ammoniumchlorid sollten die in Spuren im Medium enthaltenen Kupfer-Ionen für die Laccase verfügbar bleiben und damit zu einer höheren Laccaseaktivität und Methylantranilatkonzentration führen.

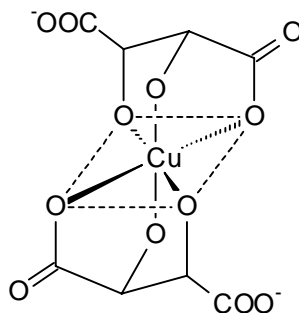


Abb. 3-3: Bis(tartrato)cuprat(II)-Komplex

Der Austausch der N-Quelle führte jedoch zu einer Reduzierung der Produktausbeute um etwa 50 % (2.2.3). Offensichtlich sind die Zusammenhänge zwischen Laccaseaktivität und Methylantranilatbildung wesentlich komplexerer Natur und nicht direkt zu korrelieren. Zur Klärung dieser Zusammenhänge sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, die jedoch nur zum Erfolg führen können, wenn konstante Methylantranilatproduktionen erreicht werden.

3.3.3.4 *In situ* Adsorption der Zielverbindung

Um die Produktausbeute zu steigern, sollte Methylantranilat aus dem Kulturmedium entfernt und damit einer weiteren Metabolisierung entzogen werden. Dies kann durch *in situ* Adsorption mit Styren-Divinylbenzen-Harzen, Zeolithen und anderen Polymeren [37,38] erreicht werden. Über den Einsatz derartiger Adsorbentien zur Gewinnung von Aromastoffen aus Kulturmedien wurde bereits berichtet [39].

Zur *in situ* Adsorption der Zielverbindung wurde den Kulturmedien daher Lewatit OC 1064, ein Styren-Divinylbenzen-Harz, zugesetzt. Das gebildete Methylantranilat wurde zu über 90 % aus dem Kulturmedium adsorbiert und konnte nahezu vollständig desorbiert werden. Die Gesamtkonzentration an Methylantranilat war mit etwa 7,3 mg L⁻¹ (Medium + Lewatitdesorbat) sehr niedrig, entsprach jedoch im Vergleich zur Kultivierung ohne Adsorbens einer Steigerung der Produktausbeute um 140 %.

Offensichtlich kann die Entfernung des Methylantranilats aus dem Kulturmedium unabhängig von der Laccaseaktivität zu einer höheren Produktausbeute führen.

3.3.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen führten mit Ausnahme der *in situ* Adsorption nicht zur Steigerung der Methylantranilatkonzentration. Die Kultivierung von *Pycnoporus cinnabarinus* und insbesondere die Bildung von Methylantranilat war trotz Konstanthaltung der kontrollierbaren Versuchsbedingungen schlecht reproduzierbar. Offensichtlich reagiert der Pilz bereits auf geringste Veränderungen der äußeren Bedingungen sehr empfindlich. Unter diesem Gesichtspunkt und in Anbetracht der Methylantranilatausbeuten von maximal 19 mg L⁻¹ erscheint eine biotechnologische Gewinnung dieses Aromastoffs mit *Pycnoporus cinnabarinus* nach dem jetzigen Stand der Kenntnisse nicht sinnvoll.

3.4 Biosynthese und Produktion von Himbeerketon

Nachdem Böker [26] sich intensiv mit der Steigerung der Produktivität befasst hatte, war das Hauptziel dieser Arbeit die Aufklärung der Biosynthese von Himbeerketon bzw. Himbeeralkohol in *Nidula niveo-tomentosa*. Ausgangspunkt hierfür war der von Böker postulierte Biosyntheseweg (**Abb. 3-4**).

Die Ergebnisse, die zu diesem hypothetischen Biosyntheschema führten, sind im folgenden kurz zusammengefasst:

- Precursorwirkung phenylpropanoider Vorstufen wie L-Phenylalanin, p-Cumarsäure und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propansäure
- Akkumulation von Phenylmethan-Körpern, v. a. Phenylmethanol und 4-Hydroxyphenylmethanol
- Markierung aus 1-¹³C-L-Phenylalanin wurde nicht in den Zielverbindungen nachgewiesen
- leicht positiver Effekt von Benzaldehyd, Benzoesäure und 4-Hydroxybenzaldehyd auf die Bildung der Zielkomponenten

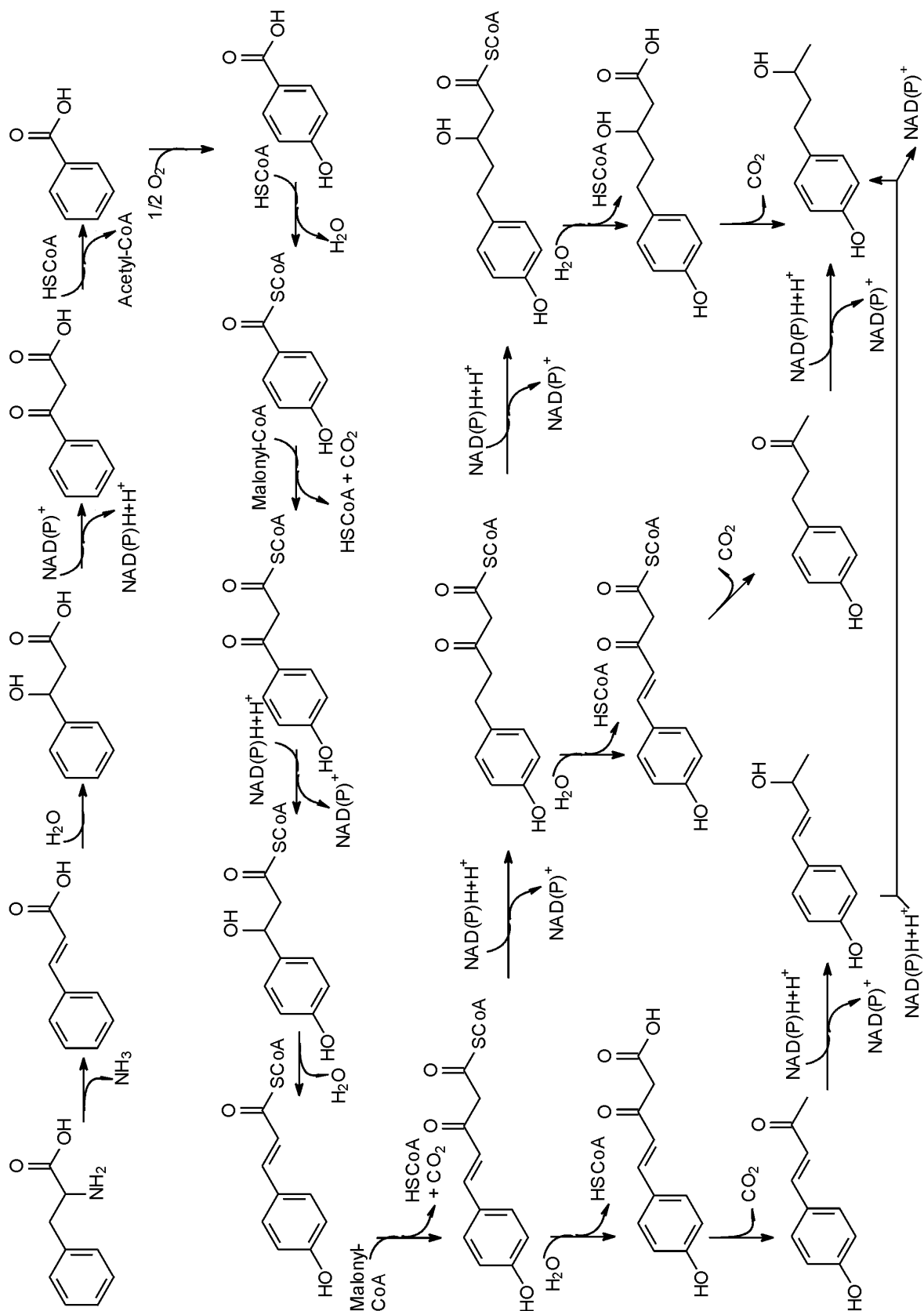


Abb. 3-4: Hypothetisches Biosyntheschema zur Bildung von Himbeerketon im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* (nach Böker [26])

In **Abbildung 3-5** sind die wichtigsten Schritte der Biosynthesewege in der Himbeere (*Rubus idaeus* L.) und im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* gegenübergestellt. Der Hauptunterschied zur Biosynthese in Himbeeren ist der Abbau der Propylseitenkette des L-Phenylalanins bis zur C₆-C₁-Stufe und die daran anschließende zweifache Kettenverlängerung durch Malonyl-CoA.

Die Biosynthese des Himbeerketons im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* lässt sich danach in zwei Abschnitte unterteilen:

- den Seitenkettenabbau vom L-Phenylalanin bis hin zum C₆C₁-Körper
- die Kettenverlängerung mit Malonyl-CoA hin zum C₆C₄-Körper.

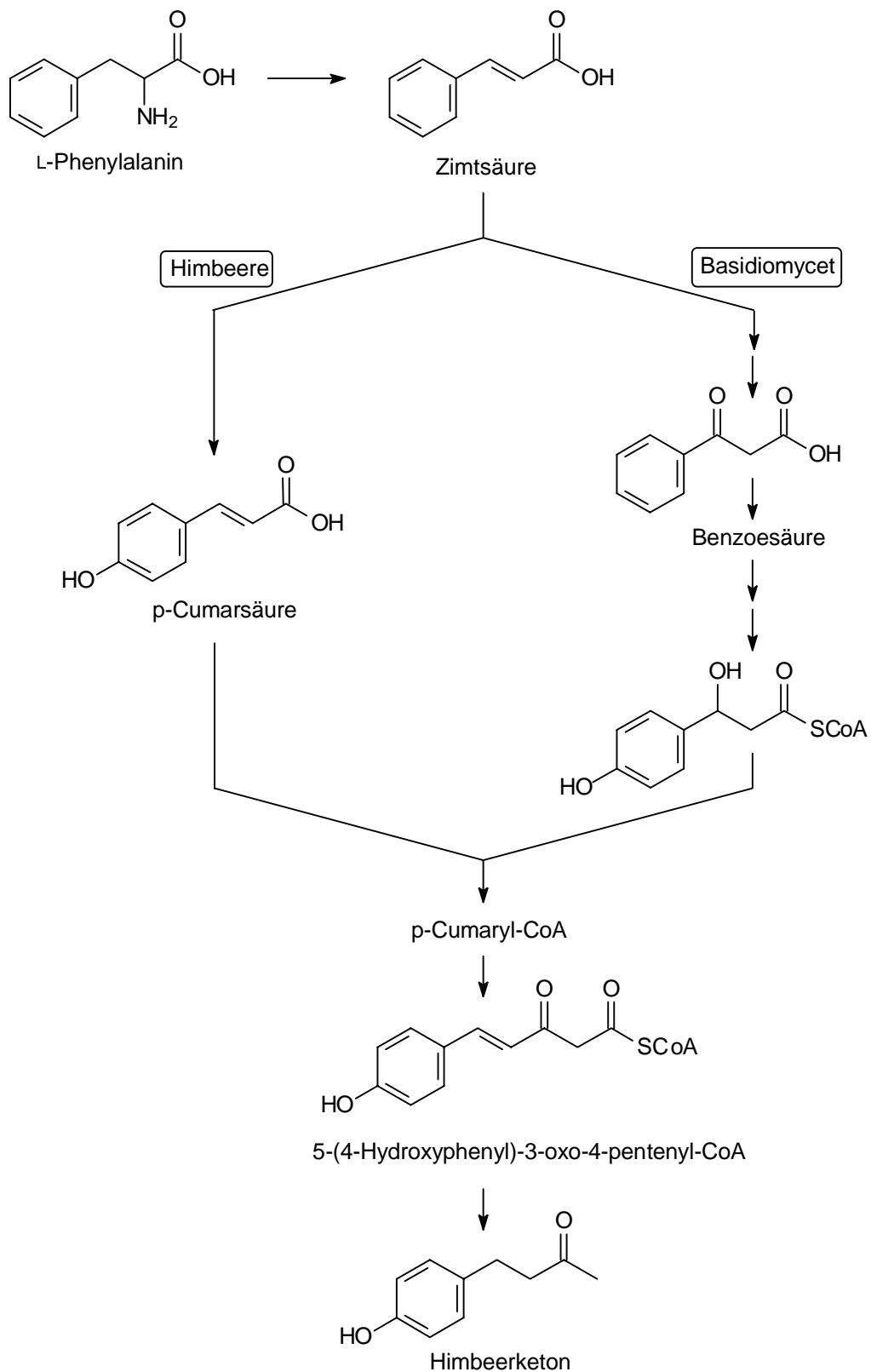


Abb. 3-5: Vergleich der Biosynthesen von Himbeerketon in der Himbeere (*Rubus idaeus*) und im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa*

3.4.1 Seitenkettenabbau

Um den Seitenkettenabbau bis zur C₆C₁-Stufe zu belegen, wurden zwei Ansatzpunkte gewählt: Zum einen die Precursoraktivität von Benzoesäure, zum anderen der Einsatz von seitenketten-markiertem L-Phenylalanin.

3.4.1.1 Precursoraktivität von Benzoesäure und Hippursäure

Benzoesäure stellt gemäß dem hypothetischen Biosyntheschema ein Intermediat der Himbeerketon-Biosynthese dar. Durch Zusatz von Benzoesäure könnte sich die Produktion von Himbeerketon steigern lassen. BÖKER fand für Benzoesäure sowie Benzaldehyd und 4-Hydroxybenzaldehyd jedoch nur leicht positive Effekte. Möglicherweise werden die jeweiligen Precursor-Eigenschaften durch ihre mikrobizide Wirkung kompensiert. Denkbar ist auch die spezifische Hemmung von Enzymen des Benzoesäure-Metabolismus (3.4.1.3). 4-Hydroxybenzoesäuremethylester wirkte erwartungsgemäß wachstumshemmend [26]. Als für den Mikroorganismus nicht toxische Quelle für die C₆C₁-Stufe sollte daher Hippursäure dienen.

Durch Zusatz von Hippursäure konnten die Produktausbeuten deutlich gesteigert werden, wodurch ihre Eignung als Precursor für die Himbeerketon-Biosynthese gezeigt wurde.

Eine Erhöhung des Hippursäurezusatzes von 1 auf 10 mmol L⁻¹ hatte keine weitere Ausbeutesteigerung zur Folge (2.3.2.1), was möglicherweise als ein Indiz für die spezifische Hemmung einzelner Enzyme zu werten ist.

3.4.1.2 Metabolisierung von Hippursäure

Hippursäure ist ein nicht toxisches Benzoesäurederivat, das vom Pilz offensichtlich aus dem Kulturmedium aufgenommen und durch eine pilzeigene N-Benzoyl-aminosäure-Hydrolase (EC 3.5.1.32) in Benzoat und L-Glycin gespalten werden

kann. Während L-Glycin dem Pilz zur Proteinbiosynthese oder als zusätzliche C- bzw. N-Quelle zur Verfügung steht, geht der Benzoessäurerest direkt als Intermediat in die Biosynthese des Himbeerketons ein und sollte somit eine Steigerung der Produktkonzentrationen bewirken.

N-Benzoylaminosäure-Hydrolase wird weder durch ihre Substrate noch durch ihre Produkte gehemmt und benötigt zur Aktivität lediglich Metallionen, jedoch keine Coenzyme oder Cofaktoren [68]. Sie wurde in zahlreichen Mikroorganismenspezies (*Fusarium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*), insbesondere bei Einsatz von Hippursäure als alleiniger C-Quelle, nachgewiesen. Als Substrate werden neben der Hippursäure meist auch andere N-Benzoylaminosäuren akzeptiert [69]. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Konzentration an N-Benzoylaminosäure-Hydrolase bzw. ihre katalytische Aktivität den limitierenden Faktor in der Biosynthese des Himbeerketons darstellt, d. h. es wird solange Benzoessäure gebildet, wie das Substrat, die Hippursäure, verfügbar ist.

3.4.1.3 Benzoessäure-Metabolismus

Die durch Hydrolyse der Hippursäure freigesetzte Benzoessäure kann auf unterschiedlichen Wegen metabolisiert werden. Die entsprechenden Enzyme sind zusammen mit den von ihnen katalysierten Reaktionen in **Tabelle 3-2** aufgeführt.

Im Gegensatz zur N-Benzoylaminosäure-Hydrolase handelt es sich bei diesen Enzymen um regulatorische Enzyme, die entweder durch ihr Substrat oder ihr Produkt inhibiert werden. Entsteht ein Überschuss an Benzoessäure, so hemmt diese ihre Hydroxylierung durch Benzoat-4-monooxygenase (**Abb. 3-6**).

Tab. 3-2: Enzyme des Benzoesäure-Metabolismus, von ihnen katalysierte Reaktionen und ihre Inhibitoren [68]

Enzym	Katalysierte Reaktion	Inhibitor
Benzoat-4-Monooxygenase (EC 1.14.13.12)	Benzoat + O ₂ + NADPH → 4-Hydroxybenzoat + NADP + H ₂ O	Benzoat
Benzoat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.25)	Benzoat + ATP + CoA → Benzoyl-CoA + AMP + PP _i	Benzoyl-CoA
4-Hydroxybenzoat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.27)	4-Hydroxybenzoat + ATP + CoA → 4-Hydroxybenzoyl-CoA + AMP + PP _i	4-Hydroxybenzoat

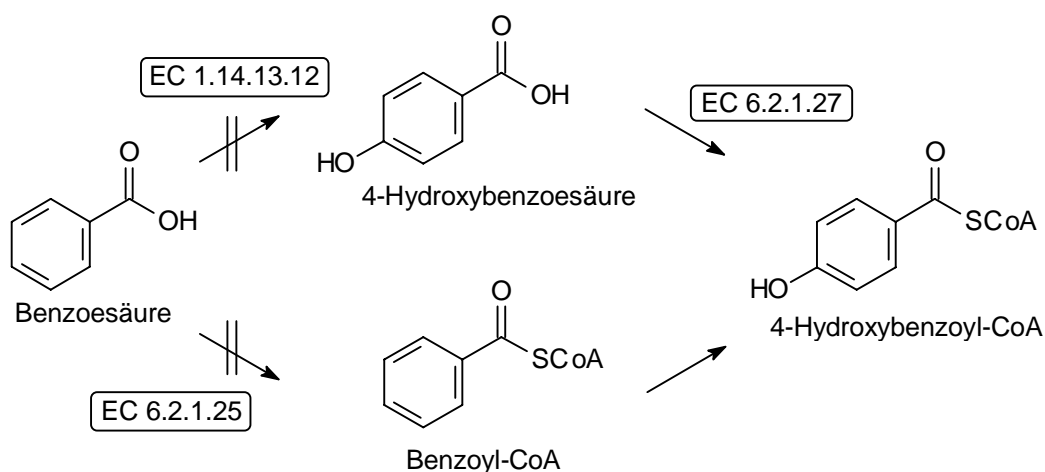


Abb. 3-6: Hemmung der am Benzoesäure-Metabolismus beteiligten Enzyme durch Benzoesäure und ihre Metabolite

Wird keine 4-Hydroxybenzoesäure gebildet, kann auch keine weitere Umsetzung zum entsprechenden CoA-Ester erfolgen; die Biosynthese zum Himbeerketon bzw. Himbeeralkohol wird unterbrochen. Die alternative Veresterung der Benzoesäure zu Benzoyl-CoA unterliegt hingegen einer Produkthemmung, d. h. bei steigender Konzentration an Benzoyl-CoA wird wiederum die weitere Metabolisierung zum Himbeerketon unterbrochen; zusätzlich akkumuliert Benzoesäure im Organismus. Da diese als Mikrobizid sowohl die Bildung der Zellwand von Mikroorganismen als auch

die Enzyme des Citronensäure-Cyclus und der oxidativen Phosphorylierung beeinflusst [44], ist eine unspezifische Hemmung des Wachstums bzw. des Primär- und Sekundärstoffwechsels ebenso denkbar. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass eine Steigerung des Zusatzes an Hippursäure von 1 auf 10 mmol L⁻¹ keine Erhöhung der Produktkonzentrationen zur Folge hatte (2.3.2.1).

3.4.1.4 Einsatz von markiertem L-Phenylalanin als Precursor

Durch den Einsatz von ringdeuteriertem L-Phenylalanin konnte bewiesen werden, dass der aromatische Ring der Zielkomponenten aus dem L-Phenylalanin stammt (2.3.1). Nach Zusatz von 1-¹³C-markiertem L-Phenylalanin wurde die Markierung jedoch weder im Himbeerketon noch im Himbeeralkohol gefunden [26].

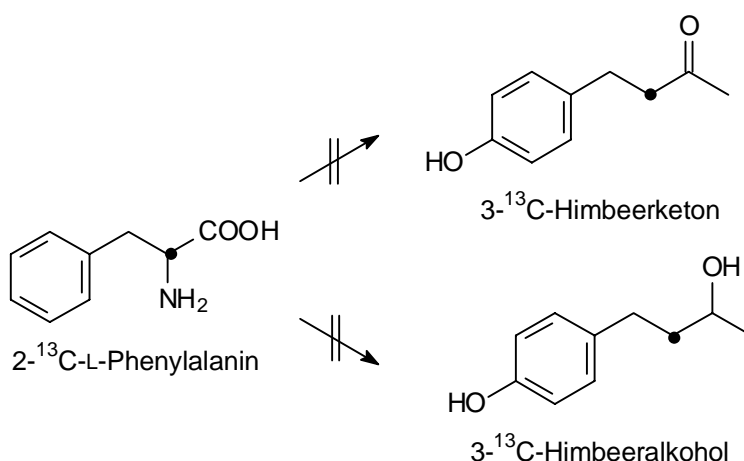


Abb. 3-7: Einsatz von 2-¹³C-L-Phenylalanin als Precursor für die Himbeerketon-Biosynthese, • = ¹³C-Atom

Als weitere Precursoren wurden 2- und 3-¹³C- L-Phenylalanin eingesetzt. Die Markierung des 2-¹³C- L-Phenylalanins wurde entsprechend dem hypothetischen Biosyntheschema in den Zielverbindungen nicht nachgewiesen (2.3.2.2 und **Abb. 3-7**). Der Zusatz von 3-¹³C- L-Phenylalanin führte hingegen zu den entsprechenden markierten Metaboliten (2.3.2.3 und **Abb. 3-8**).

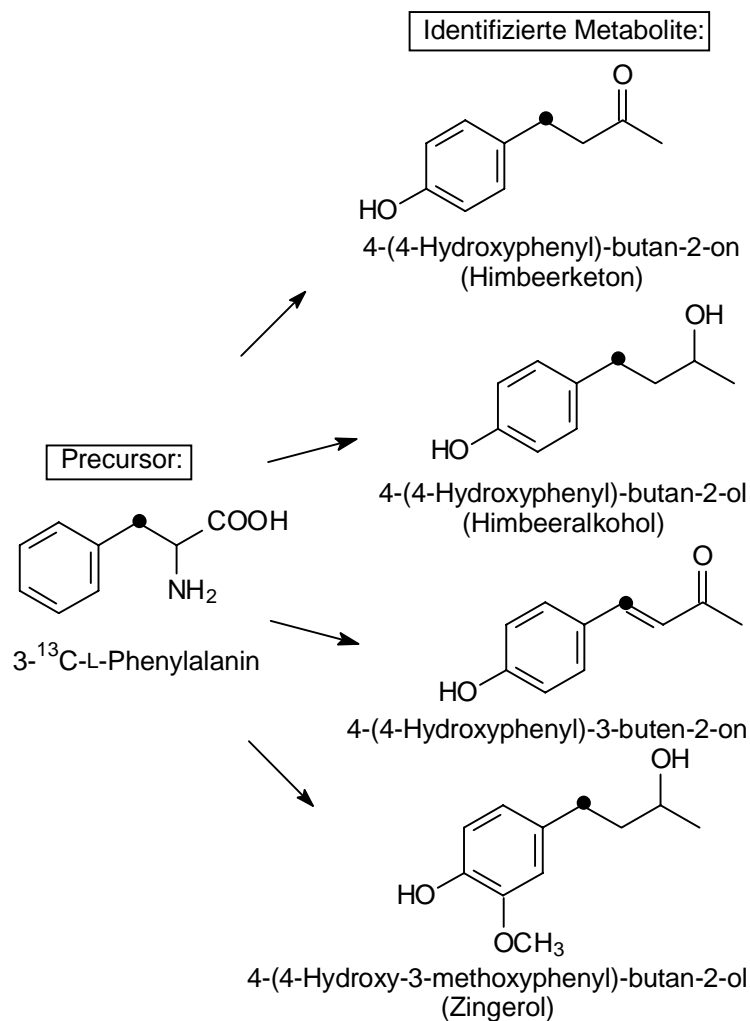


Abb. 3-8: Übersicht über die identifizierten markierten Metabolite nach Zusatz von 3-¹³C-L-Phenylalanin, • = ¹³C-Atom

Dieses Resultat belegt nochmals, dass L-Phenylalanin als Precursor zur Biosynthese von Himbeerketon bzw. Himbeeralkohol dient. Die Propylseitenkette des L-Phenylalanins wird offensichtlich nach Desaminierung bis zum C₆C₁-Körper abgebaut, woran sich eine Seitenkettenverlängerung anschließen muss.

3.4.2 Seitenkettenaufbau

Hinsichtlich des Seitenkettenaufbaus wurden folgende Aspekte untersucht:

- Steigerung der Produktivität durch Zusatz von kurzkettigen „Precursoren“
- Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase
- Zusatz von ^{13}C -markierter Glucose

3.4.2.1 Zusatz von kurzkettigen „Precursoren“

Zur Steigerung der Produktausbeuten wurden verschiedene kurzkettige Verbindungen als „Precursoren“ für die Butylseitenkette der Zielverbindungen ausgewählt (**Abb. 3-9**). Dabei handelt es sich um Substanzen, die entweder direkt (Malonat, Dimethylmalonat) oder indirekt zur Bildung von Malonyl-CoA (Acetat, Pyruvat, Succinat, L-Alanin) beitragen.

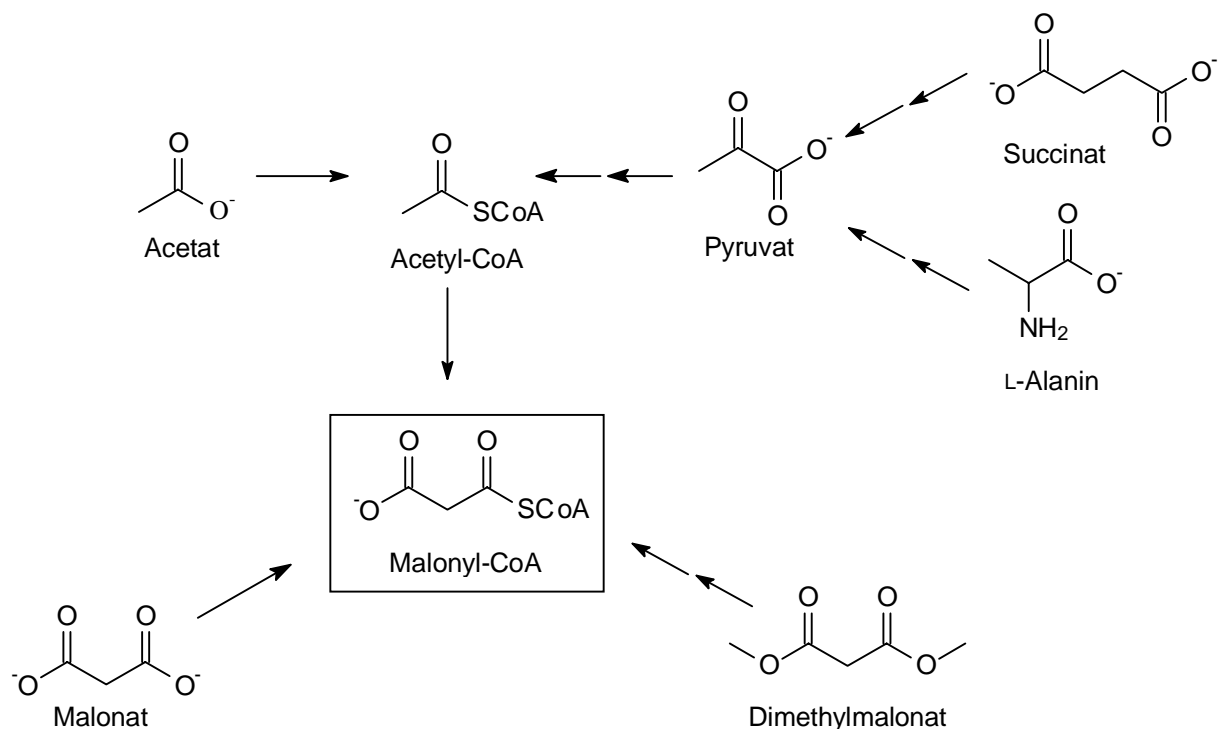


Abb. 3-9: Ausgewählte „Precursoren“ als Vorläufersubstanzen für Malonyl-CoA

Die Konzentrationen an Himbeerketon und Himbeeralkohol konnten auch bei gleichzeitigem Zusatz von Hippursäure durch diese „Precursoren“ nicht gesteigert werden. Die gebildeten Produktmengen lagen sogar deutlich unter den Werten, die in nicht supplementiertem Sojapepton-Medium erreicht wurden.

Offensichtlich werden die zugesetzten Verbindungen von *Nidula niveo-tomentosa* nicht zur Biosynthese der Zielverbindungen genutzt. Möglicherweise fehlen geeignete Transportmechanismen zur Aufnahme dieser „Precursoren“, wodurch sie nicht zum Ort der Biosynthese gelangen. Möglich ist auch, dass der Pilz diese Verbindungen effizienter für die Bildung anderer sekundärer oder primärer Metabolite genutzt hat (s. auch **3.2**).

3.4.2.2 Phenylbutanoide Substanzen als Nebenprodukte des Phenylpropanoid-Stoffwechsels

Viele der pflanzlichen Sekundärmetabolite und Zellwandbestandteile wie beispielsweise Phenole, Chalcone, Flavonoide, Stilbene, Tannine und Lignane gehören der Klasse der phenylpropanoiden Stoffe an, enthalten also einen Benzenring mit C₃-Seitenkette. Chalcone, Flavonoide und Stilbene besitzen neben dem Phenylpropangerüst einen zweiten aromatischen Ring, der - analog zur postulierten Seitenkettenverlängerung des Himbeerketons - aus Malonyl-CoA gebildet wird [70].

Die Startreaktion des Phenylpropanoid-Stoffwechsels ist in der Regel eine Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-katalysierte (PAL, EC 4.3.1.5) Desaminierung von L-Phenylalanin, worauf die gebildete Zimtsäure zur p-Cumarsäure hydroxyliert wird. Diese beiden Reaktionen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels leiten auch die Biosynthese des phenylbutanoiden Himbeerketons in der Himbeere ein (**Abb. 3-5**).

Während zahlreicher Untersuchungen zur Biosynthese von Flavonoiden wurden als Nebenprodukte auch phenylbutanoide Substanzen, darunter 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on (**Abb. 2-14**), detektiert [71,72]. BOREJSZA-WYSOCKI und HRAZDINA konnten durch Einsatz von Cumaryl-CoA und 2-¹⁴C-Malonyl-CoA in Versuchen mit zellfreien Himbeerextrakten sowohl 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on als auch dessen

Umsetzung zum Himbeerketon nachweisen. Sie isolierten daraufhin ein Enzym, dem sie den Namen Benzalacetonsynthase gaben, und das sie mit der Chalconsynthase und der Stilbensynthase zur Gruppe der aromatischen Polyketid-Synthasen zusammenfassten [73,74].

3.4.2.3 Das Himbeerketon - ein Polyketid?

Wichtige Zwischenprodukte der Biogenese von Phenylpropanoiden sind die sogenannten Polyketide. Darunter versteht man Naturstoffe, die über Polyketosäuren als Intermediate gebildet werden; häufig verwandt wird auch der Begriff Acetogenine (Derivate der Essigsäure). Polyketide findet man nicht nur in höheren Pflanzen, sondern auch in Mikroorganismen. Dort spielen sie sowohl im Sekundärmetabolismus als auch im Primärmetabolismus beispielsweise als Intermediate der Fettsäurebiosynthese eine wichtige Rolle. Es bestehen also enge Beziehungen zwischen der Biosynthese der Fettsäuren und der der Polyketide, wie inzwischen auch auf der Ebene der jeweils beteiligten Enzymkomplexe bestätigt werden konnte [75,76].

Polyketid-Synthasen (PKS) sind ebenso wie Fettsäure-Synthasen Multienzymkomplexe. Sie enthalten Transferasen (Acetyl-, Malonyl-) zur Kettenverlängerung, eine β' -Ketoacyl-Synthase als kondensierendes Enzym, eine Keto-Reduktase und – Dehydratase. Die Enoyl-Reduktase der Fettsäure-Synthase fehlt, dafür existieren zusätzliche Enzymaktivitäten wie Cyclasen oder Aromatasen sowie eine Thioesterase für die Freisetzung der Produkte vom Enzymkomplex.

Man unterscheidet prinzipiell zwei Typen von PKS: Typ I weist katalytische Stellen für die unterschiedlichen Biosyntheseschritte in Form von Domänen über das ganze Protein verteilt auf. Typ II besitzt für jeden Reaktionsschritt eine separate Protein-Untereinheit [75-81].

Während die β -ständige Carbonylgruppe bei der Fettsäuresynthese in drei Schritten zur CH_2 -Gruppe reduziert wird, bleiben bei der Polyketidsynthese meist Sauerstofffunktionen in β -Stellung erhalten. Durch Cyclisierungen, Enolisierungen,

Methylierungen und weitere Reaktionen werden sie in z. T. sehr komplexe Metabolite des Sekundärstoffwechsels umgewandelt. Dazu gehören Stilbene wie Resveratrol (*Arachis hypogaea*), Naringenin-chalcon und Flavonoide wie Cyanidin ebenso wie 6-Methylsalicylsäure und das Mykotoxin Patulin (*Penicillium patulum*) sowie Antibiotica wie das Oxytetracyclin (*Streptomyces rimosus*) [75,77,80]. Dabei werden pilzliche Polyketide ausschließlich von Acetat und Malonat ausgehend gebildet [81].

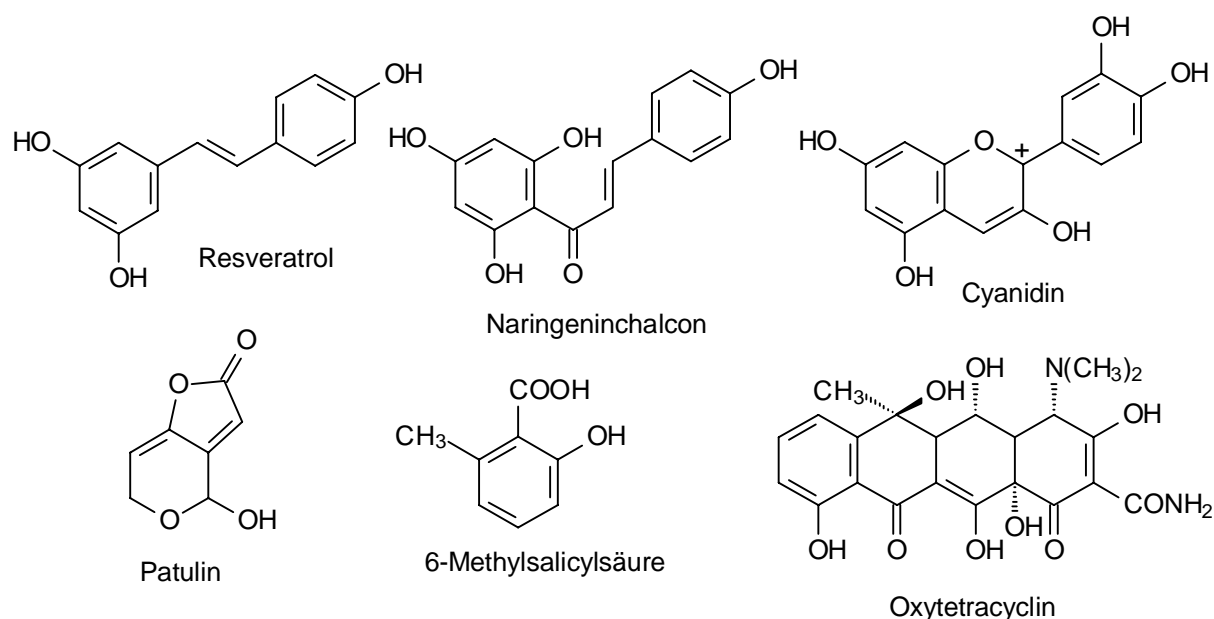


Abb. 3-10: Natürlich vorkommende pflanzliche und mikrobielle Polyketide

3.4.2.4 Acetyl-CoA-Carboxylase

BÖKER hatte in seinem hypothetischen Biosyntheschema eine zweifache Kettenverlängerung über Malonyl-CoA postuliert (**Abb. 3-4**). Eine entsprechende Reaktion findet sich auch bei der Fettsäurebiosynthese.

Das für die Kettenverlängerung der Fettsäuren benötigte Malonyl-CoA wird durch Carboxylierung von Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2) geliefert. Die Übertragung des "aktivierten CO₂" erfolgt über Biotin, welches durch eine Carboxylseitenkette mit der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Biotin-Carboxyl-Carrierproteins kovalent verknüpft ist (**Abb. 3-11**). Zunächst carboxyliert die Biotin-

Carboxylase unter ATP-Spaltung Biotin; anschließend überträgt die Carboxyl-Transferase die Kohlensäuregruppe auf das Acetyl-CoA [44,76].

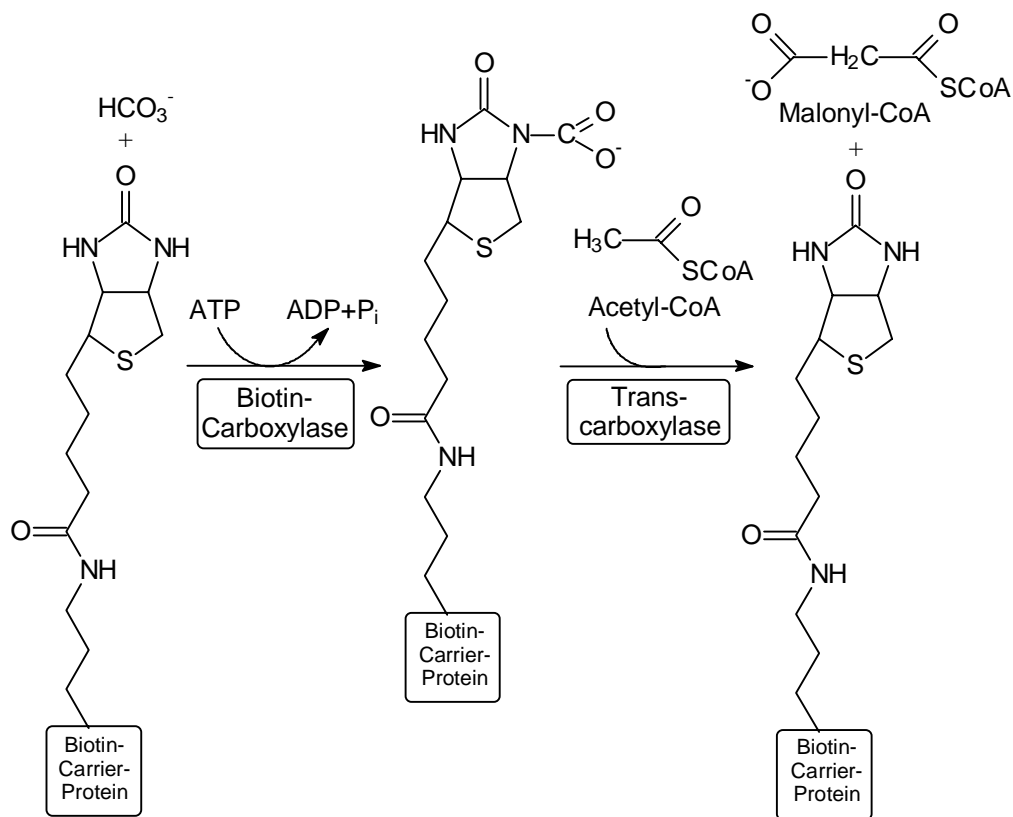


Abb. 3-11: Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch ACC

Man unterscheidet zwei Formen der Acetyl-CoA-Carboxylasen: Einen ACC-Multienzymkomplex, bestehend aus den drei Untereinheiten Biotin-Carboxylase, Biotin-Carboxyl-Carrierprotein und Carboxyl-Transferase, sowie ein multifunktionelles ACC-Enzymprotein, bei dem die Funktionen auf verschiedenen Abschnitten der gleichen Polypeptidkette lokalisiert sind [70,75,76].

Da der ACC-Multienzymkomplex im Stroma der Plastiden große Ähnlichkeit zu den bakteriellen Acetyl-CoA-Carboxylasen aufweist, bezeichnet man ihn auch als prokaryotische Form. Das multifunktionelle Protein findet sich in sehr ähnlicher Form auch im Cytosol von Hefen und Tieren und wird deshalb als eukaryotische Form der ACC bezeichnet. Eukaryotische ACC kommt auch in Pflanzen (außerhalb der Plastiden, wahrscheinlich im Cytosol) vor. Das dort gebildete Malonyl-CoA dient der

Kettenverlängerung von Fettsäuren und als Ausgangsprodukt für die Bildung von Phenylpropanoiden [70].

Da höhere Pilze zu den Eukaryoten zählen, ist anzunehmen, dass es sich auch in *Nidula niveo-tomentosa* um die eukaryotische Form der ACC handelt.

3.4.2.5 Diclofop-methyl

Eukaryotische ACC wird durch verschiedene Arylphenoxypropansäurederivate, wie beispielsweise Diclofop-methyl (**Abb. 3-12**) gehemmt [82]. Da sich in *Gramineen* auch innerhalb der Plastiden die eukaryotische Form der ACC, die an der *de novo* Fettsäuresynthese beteiligt ist, findet, wird die Lipidsynthese von *Gramineen* durch diesen Hemmstoff besonders stark beeinträchtigt. Man setzt Diclofop-methyl und verwandte Substanzen daher als selektive Herbizide gegen Gräser ein [70].

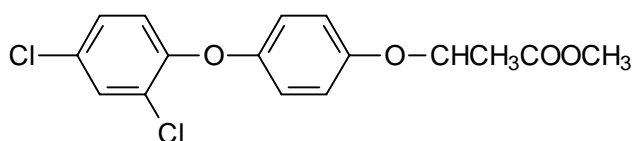


Abb. 3-12: 2-[4-(2,4-Dichlorphenoxy)-phenoxy]-propansäuremethylester
(Diclofop-methyl)

Falls die Carboxylierung von Acetyl-CoA im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* ebenfalls mittels eukaryotischer ACC erfolgt, sollte die Biosynthese des Himbeerketons durch Zusatz von Diclofop-methyl inhibiert werden.

In Kulturen mit Diclofop-methyl als Inhibitor wurde deutlich weniger Himbeerketon und Himbeeralkohol gebildet. Dagegen stiegen die Konzentrationen an Benzaldehyd und Phenylmethanol signifikant an (**2.3.3.2**). Dies deutet darauf hin, dass der Phenylalanin-Metabolismus bis zur C₆C₁-Stufe regulär verläuft. Anschließend findet eine Reduktion der Benzoessäure-Derivate zu Benzaldehyd und Phenylmethanol statt.

Die Verschiebung im Aromaprofil ist dabei stark abhängig von der Konzentration an Inhibitor. Ein 0,1 mM Zusatz reichte nicht aus, um die Malonyl-CoA-Synthese bzw. die Bildung des Himbeerketons komplett zu unterdrücken (**2.3.3.2**), während dies bei Zusatz von 0,5 mmol Diclofop-methyl L⁻¹ praktisch quantitativ gelang (**2.3.3.3**).

Die unter Zusatz von Diclofop-methyl durchgeführten Experimente deuten somit auf das ausschließliche Vorhandensein einer der eukaryotischen Form ähnlichen ACC in *Nidula niveo-tomentosa* hin.

3.4.2.6 Zusatz von markierter D(+)-Glucose

Da es sich bei Pilzen generell um heterotrophe Organismen handelt, werden den Medien zu ihrer Kultivierung C-Quellen zugesetzt. Als solche wird häufig D(+)-Glucose verwendet, weil die Glykolyse der am weitesten verbreitete Abbauweg für Kohlenhydrate ist [33]. Sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Organismus wird D(+)-Glucose auf diesem Wege über Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu Acetyl-CoA metabolisiert (**Abb. 3-13**). Dabei entstehen aus einem Molekül D(+)-Glucose jeweils ein Molekül Dihydroxyacetonphosphat (Glyceronphosphat) und ein Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat (Glyceralphosphat), die über die gemeinsame Enolform miteinander im Gleichgewicht stehen [44].

Zur Klärung der Herkunft des Malonyl-CoA zur Seitenkettenverlängerung wurde als C-Quelle 1-¹³C-markierte D(+)-Glucose eingesetzt. Dem in **Abbildung 3-13** dargestellten Metabolismus folgend findet sich die Markierung des C1-Atoms der D(+)-Glucose in Dihydroxyacetonphosphat und schließlich in 2-Position eines Acetyl-CoA-Moleküls wieder.

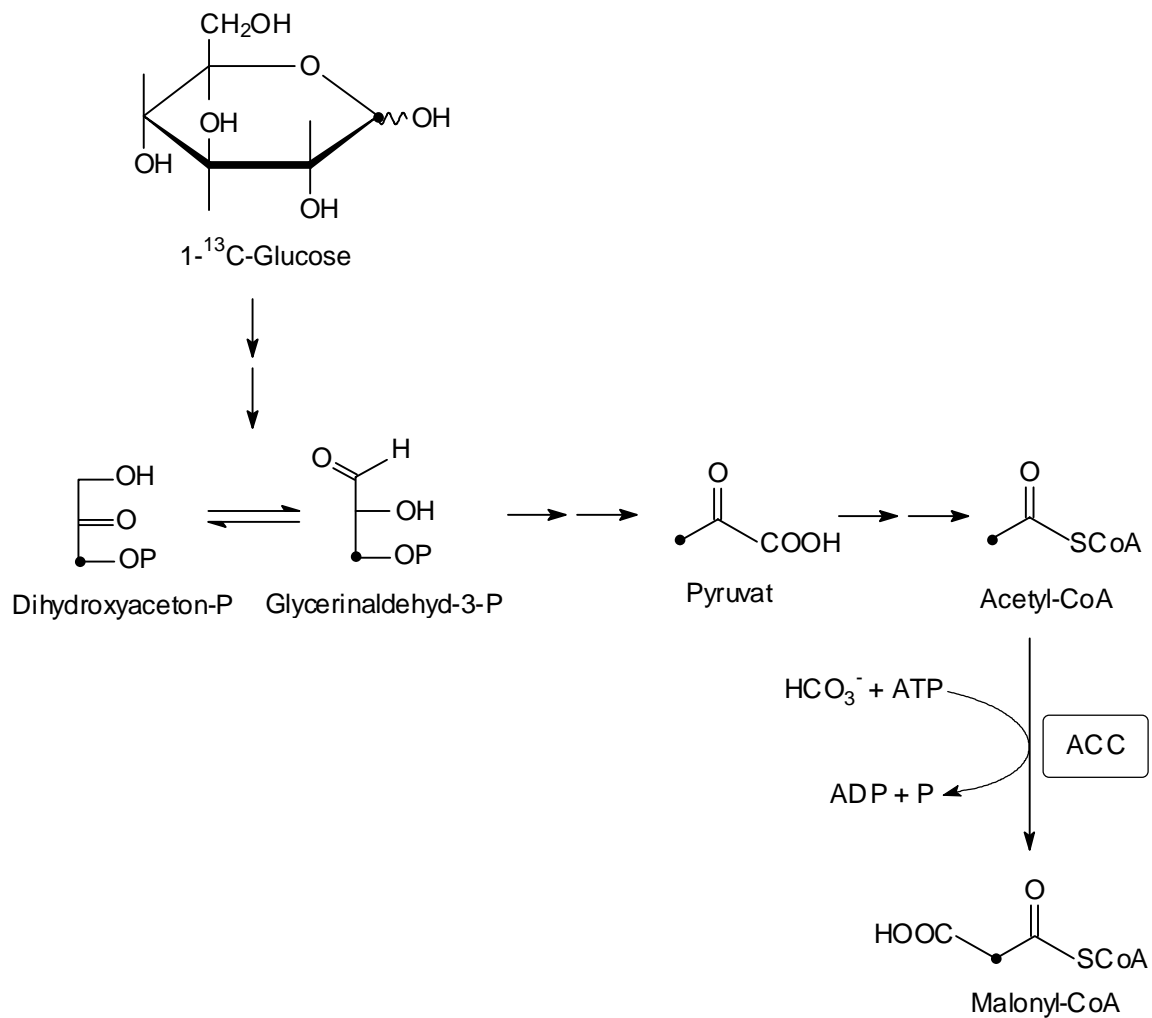


Abb. 3-13: Metabolisierung von D(+)-Glucose und Bildung von Malonyl-CoA

ACC = Acetyl-CoA-Carboxylase, • = ¹³C-Atom

Geht man bei der Himbeerketon-Biosynthese von einem Seitenkettenaufbau durch Kondensation eines C₆-C₁-Körpers mit zwei Malonyl-CoA-Einheiten aus, müssten sich die Markierungen jeweils am C1- und C3-Atom des Himbeerketons bzw. Himbeeralkohols wiederfinden (**Abb. 3-14**).

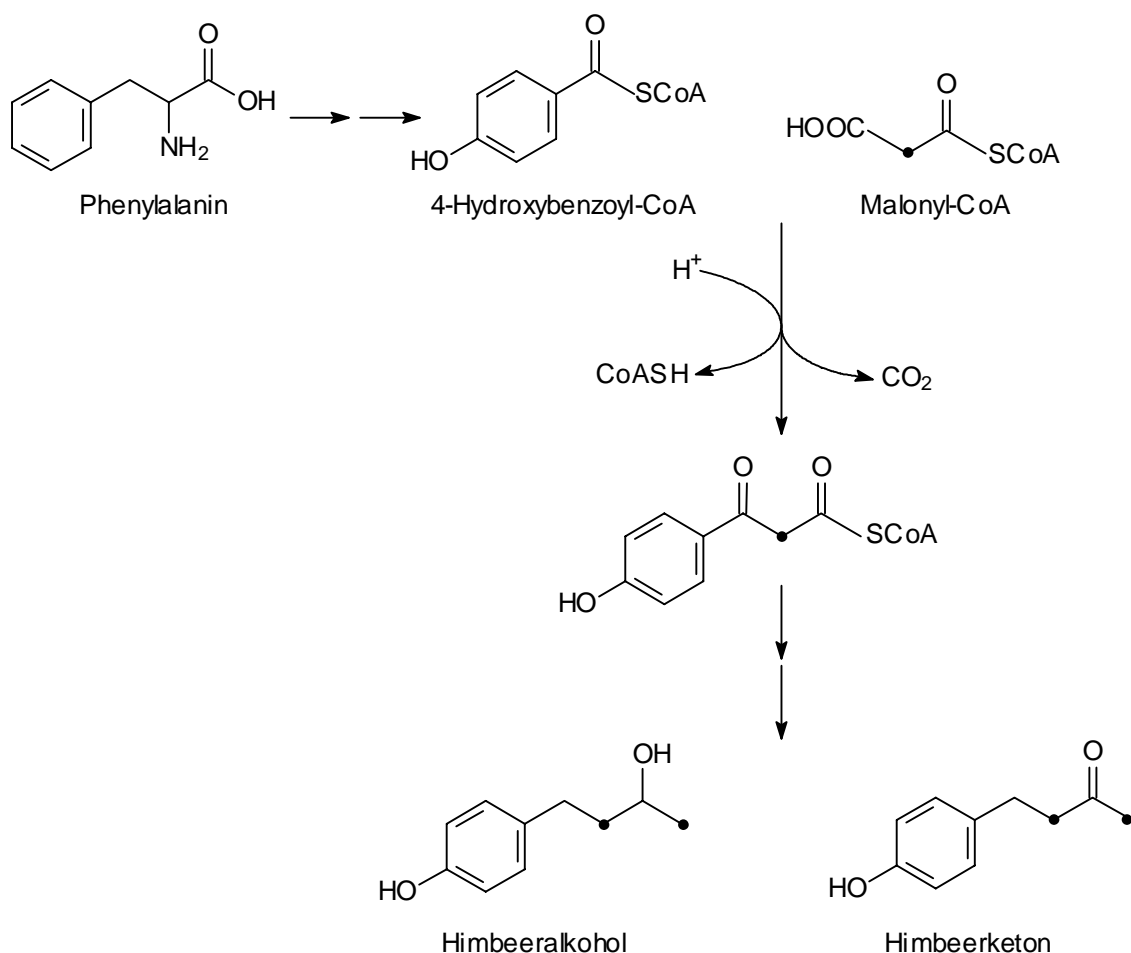


Abb. 3-14: Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol durch Kondensation von 4-Hydroxybenzoyl-CoA und Malonyl-CoA und Position der ¹³C-Markierung in den Zielverbindungen, • = ¹³C-Atom

Nach Zusatz der 1-¹³C-D(+)-Glucose wurden Himbeerketon und Himbeeralkohol mittels GC-AED in markierter Form nachgewiesen (**Abb. 2-29**). Anhand der zugehörigen Massenspektren wurden die ¹³C-Markierungen in der Seitenkette eindeutig identifiziert (**Abb. 2-30**). Dies beweist, dass der Aufbau der Butylseitenkette der Zielverbindungen aus Acetyl-CoA erfolgt, welches zuvor wahrscheinlich zu Malonyl-CoA carboxyliert wurde.

Trotz der eindeutigen Ergebnisse wird sowohl aus den GC-AED-Chromatogrammen als auch aus den Massenspektren deutlich, dass neben zweifach markiertem Himbeerketon und Himbeeralkohol auch unmarkierte und einfach markierte Formen

vorliegen. Dies ist damit zu erklären, dass ein Molekül Glucose jeweils zwei Moleküle Acetyl-CoA bzw. Malonyl-CoA liefert, von denen aber nur eines eine ^{13}C -Markierung trägt. Darüberhinaus finden sich in einem komplexen Nährmedium wie dem hier verwendeten Sojapepton-Medium auch weitere C-haltige Verbindungen wie Aminosäuren und Fettsäuren, die über Acetyl-CoA metabolisiert und infolgedessen in die Zielverbindungen eingebaut werden können.

3.4.3 Biosynthese des Himbeerketons an einem Multienzym-Komplex

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit *Nidula niveo-tomentosa* deuten auf das Vorliegen eines Multienzym-Komplexes hin.

- Es konnten keine Intermediate isoliert werden und die eingesetzten β -Hydroxypropansäuren zeigten keine Precursoraktivität (2.3.4.1).

Synthesen an Multienzym-Komplexen zeichnen sich dadurch aus, dass keine Intermediate freigesetzt werden und der Quereinstieg auf einer Zwischenstufe gehemmt oder sogar unmöglich ist.

- die Biosynthese konnte durch Diclofop-methyl gehemmt, aber durch Zusatz von Malonat nicht gesteigert werden (2.3.3.3)
- die Isolierung eines aktiven Enzymkomplexes scheiterte (2.3.4.2).

Als Precursoren wurden u. a. Substanzen eingesetzt, die auf Grund ihrer schlechten Verträglichkeit für den Pilz zu einem verminderten Wachstum führten. Es handelte sich dabei um mögliche Intermediate aus dem hypothetischen Biosyntheschema von Böker [26].

Um die Precursorwirkung dieser Substanzen unabhängig von ihren wachstumshemmenden Eigenschaften untersuchen zu können, wurde aus den Pilzkulturen ein Enzymrohextrakt gewonnen und mit diesen Precursoren versetzt. Dabei wurden keinerlei Umsetzungen beobachtet.

3.4.4 Induktion durch Sauerstoff-Mangel

BÖKER hatte den Kulturen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung Wasserstoffperoxid zugesetzt, weil er vermutete, dass die Reduktion des Himbeerketons zum Himbeeralkohol analog der alkoholischen Gärung der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten dient. Er konnte jedoch keinen Einfluss auf das Verhältnis der beiden Zielverbindungen zueinander feststellen. ANKE [49] hatte eine Induktion des Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen durch Sauerstoffmangel beobachtet.

Die Trockenmassen in den dicht abgeschlossenen Kolben lagen mit 3,5 bis 6,4 g L⁻¹ unter denen in den normal geführten Kulturen (7,4 bis 7,9 g L⁻¹) (2.3.5.1). Die Konzentrationen an Himbeeralkohol lagen deutlich unter den bisher erreichten Gehalten. Als Hauptmetabolite wurden neben Himbeeralkohol Himbeerketon, die stellungsisomeren Zingerole sowie 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on und 4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-on detektiert. In der Kultur mit der schlechtesten Sauerstoffversorgung (200 mL Kolben, dichtverschlossen, 24 h ohne Agitation) war das Verhältnis Himbeerketon zu Himbeeralkohol zu Gunsten des Himbeerketons verschoben.

Eine Induktion des Sekundärmetabolismus unter Sauerstoffmangelbedingungen konnte im Hinblick auf die Bildung von Himbeerketon und Himbeeralkohol jedoch nicht festgestellt werden.

3.5 Extraktion flüchtiger Selenverbindungen aus Lebensmitteln

In der Natur vorkommende Aromastoffe sind häufig reine Kohlenwasserstoffe oder oxyfunktionalisierte Verbindungen wie das Himbeerketon. Daneben finden sich aber auch stickstoff- und schwefelhaltige Verbindungen. Letztere haben besonders für das Aroma von Liliaceen und Brassicaceen große Bedeutung, wurden aber auch in exotischen Früchten wie beispielsweise der gelben Passionsfrucht (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) nachgewiesen [83]. Der S-haltige Aromastoff 1-para-Menthen-8-thiol, die Aromaleitsubstanz des Grapefruitsaftes, gehört mit einem Geruchsschwellenwert von 0,02 ng L⁻¹ zu den potentesten Aromastoffen überhaupt [84].

3.5.1 Vorkommen und Bedeutung von Selen

Mit einem Anteil von $9 \times 10^{-6} \%$ an den obersten 16 km der festen Erdkruste gehört Selen zu den weniger häufigen Elementen. Reine Selen-Mineralen kommen daher sehr selten vor; dagegen findet man Selenide häufig in kleinen Mengen mit den isomorphen Sulfiden vergesellschaftet [85]. Selen und seine Verbindungen wirken häufig stark toxisch und Tiere und Pflanzen enthalten meist nur äußerst geringe Mengen. In Form von Selenocystein kommt es in Enzymen wie der Glutathion-Peroxidase, dem Selenoprotein P und der Tetraiodothyronin-5'-deiodinase vor, worauf seine Essenzialität für Menschen und Säugetiere beruht [86]. Die beim Menschen bekannteste Selen-Mangelerkrankung ist die in Nordost-China verbreitete „Keshan disease“. Daneben werden Rheumatismus und Grauer Star mit einem Selen-Mangel in Verbindung gebracht [87], und auch eine Schutzfunktion des Selens vor Krebserkrankungen und vorzeitiger Alterung wird diskutiert [88].

In Pflanzen findet man Selen überwiegend in Form von L-Selenomethionin, dem Se-Analogen der Aminosäure L-Methionin [85]. Bei Se-sensitiven Pflanzen kann der Einbau der Seleno-Aminosäuren in Proteine bzw. Enzyme zu Funktionsstörungen führen. Selen-akkumulierende Pflanzen, die bis zu 10 % Selen aus dem Erdboden speichern können, inkorporieren das Selen dagegen vor allem in nicht proteinogene Aminosäuren wie Se-Methyl-selenocystein, Selenocystein-Se-oxid, γ -L-Glutamyl-Se-methyl-selenocystein, Selenocystathionin und Selenocystin (**Abb. 3-15**) [86,89]. In Knoblauch, Zwiebeln und Brokkoli, die zu den Se-akkumulierenden Pflanzen gehören, konnten CAI *et al.* nach Se-Anreicherung hauptsächlich Selenocystein und Se-Methylselenocystein nachweisen [90].

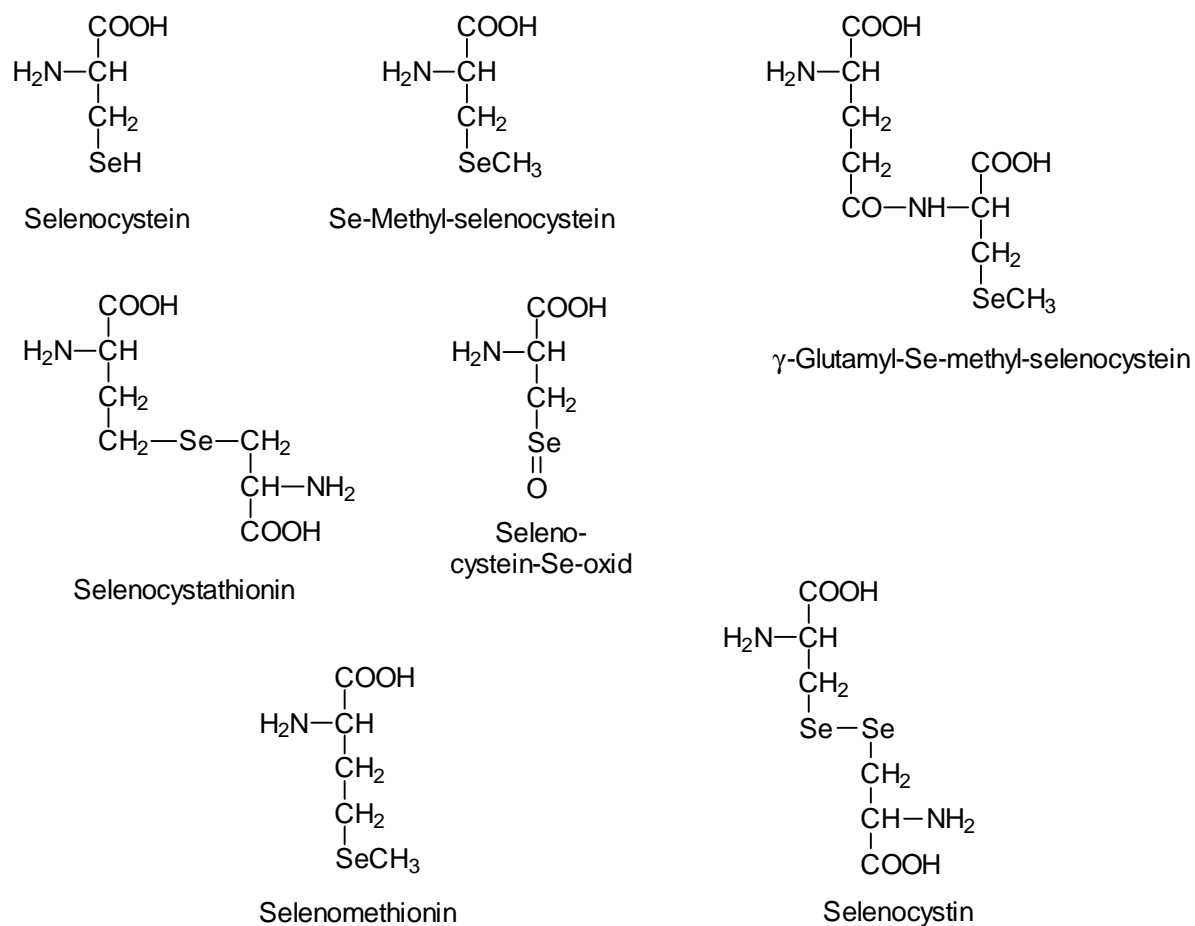


Abb. 3-15: Selen-Analoga S-haltiger Aminosäuren

3.5.2 Biogenese flüchtiger selenhaltiger Verbindungen

Da insbesondere L-Cystein und seine Sulfoxide als Substrate der Alliinase und damit als Vorläufer verschiedener Aromastoffe dienen (**Abb. 3-16**) [91], ist auch das Vorkommen der entsprechenden selenhaltigen Verbindungen beispielsweise in Knoblauch denkbar.

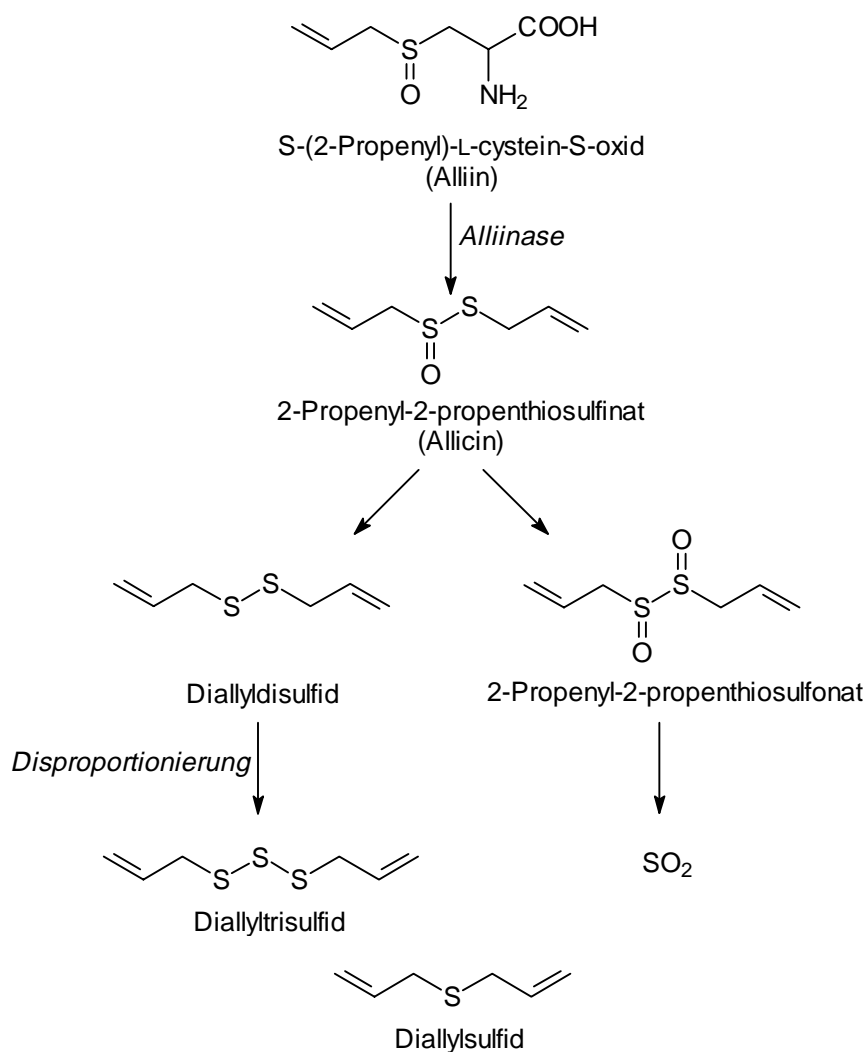


Abb. 3-16: Beispiele für die Bildung S-haltiger Aromastoffe aus Cystein-S-oxiden

In Untersuchungen aus dem Jahre 1994 gelang CAI *et al.* bereits der Nachweis verschiedener Selenide in Alliumarten [53]. Studien von FLEET-STALDER *et al.* und CHASTEEN berichteten über selenhaltige Verbindungen in Bakterien [93,94,95]. Daten über Geruchseigenschaften und Schwellenwerte der beschriebenen Komponenten (**Tab. 3-3**) liegen bislang allerdings nicht vor. Das als Standardsubstanz eingesetzte Dimethyldiselenid wird vom Hersteller als geruchsbelästigend eingestuft [92].

Tab. 3-3: Natürlich vorkommende flüchtige Se-haltige Verbindungen

Organismus		Verbindungen	Ref.
<i>Allium sativum</i> (Knoblauch)		Dimethylselenid	[90, 53]
<i>Allium cepa</i> (Zwiebel)		Allylmethylselenid	
<i>Allium tuberosum</i> (chinese chive)		Dimethyldiselenid	
<i>Allium ampeloprasum</i> (elephant garlic)		Dimethylselenenylsulfid	
		Bis-(methylthio)selenid	
		(E,Z)-1-Propensulfenoselen säuremethylester	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		Dimethylselenid	[93]
		Dimethyldiselenid	
		Dimethylselenenylsulfid	
	CH ₃ SeH	Methanselenol	
<i>Aeromonas</i> sp. VS6	CH ₃ SeH	Methanselenol	[94]
<i>Citrobacter freundii</i> KS8		Dimethylselenid	
<i>Pseudomonas</i> spp.		Dimethyldiselenid	[95]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K27		Dimethylselenid	
<i>Penicillium citrinum</i>		Dimethyldiselenid	
<i>Acremonium falciforme</i>			

Die in Kulturen verschiedener Mikroorganismen gefundenen Alkylselenide wurden nach Supplementierung des Mediums mit Selenat bzw. Selenit identifiziert [93,94,95]. Die Biosynthese ist hier durch Methylierung und mehrfache Reduktion der ionischen Spezies (**Abb. 3-17**) oder über elementares Selen als Intermediat postulierbar (**Abb. 3-18**).

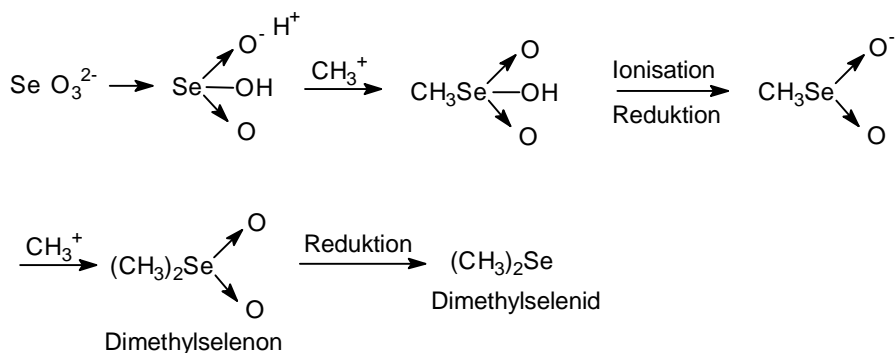


Abb. 3-17: Mikrobielle Bildung von Dimethylselenid aus Seleniten mit Dimethylselenon als Intermediat, nach Challenger [94]

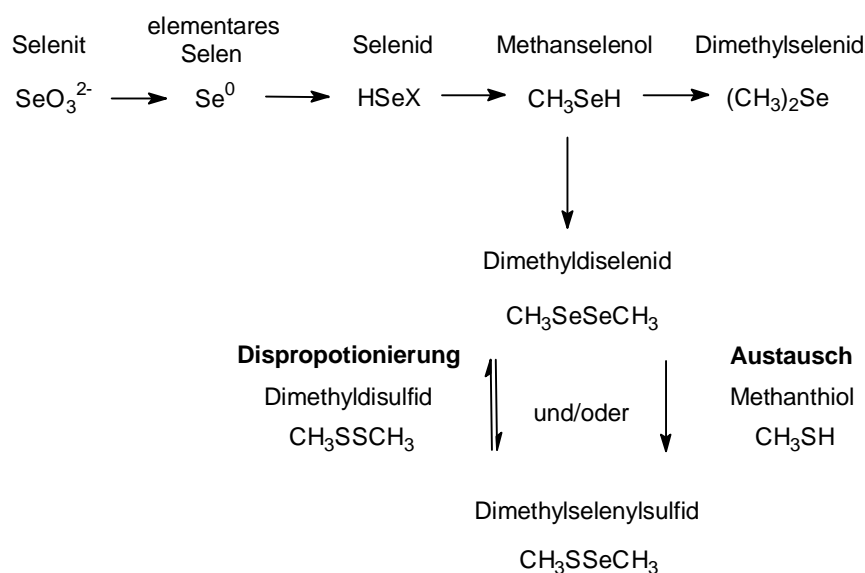


Abb.3-18: Mikrobielle Bildung von Dimethylselenid und Folgeprodukten mit elementarem Selen als Intermediat, nach Doran und Chasteen *et al.* [94]

3.5.3 Analytik flüchtiger selenhaltiger Verbindungen in Lebensmitteln mittels GC-AED

Für die Suche nach flüchtigen selenhaltigen Verbindungen kommen auf Grund ihrer natürlichen Gehalte und dem Vorkommen schwefelhaltiger Aromastoffe vor allem Liliaceen und Brassicaceen in Frage. Speisepilze weisen mitunter wesentlich höhere

Selengehalte auf, enthalten jedoch mit Ausnahme des Shiitake kaum flüchtige schwefelhaltige Verbindungen (**Tab. 3-4**).

Tab. 3-4: Selengehalte ausgewählter Lebensmittel

Lebensmittel	Se-Gehalt [$\mu\text{g pro 100 g}$] ^a	Ref.
Knoblauch	5,69	[52]
Brokkoli	0,70	[52]
Meerrettich	0,20	[52]
Spinat	0,80	[52]
Pfifferling	0,55	[52]
Steinpilz	184	[52]
Champignon	130-574	[96]
Austernseitling	35-105	[96]
Shiitake	54-93	[96]

^a = Gehalt bezogen auf 100 g essbaren Anteil

Ausgehend von den Arbeiten von CAI *et al.* [53] sollten im Rahmen dieser Arbeit Lebensmittel aus dem europäischen Raum auf das Vorkommen der oben diskutierten Verbindungen und ggf. auch auf bislang unbekannte flüchtige selenhaltige Spurenstoffe hin untersucht werden.

Neben den Absolutgehalten an Selen (**Tab. 3-4**) wurden zur Plausibilitätsabschätzung die Mengen an schwefelhaltigen Aromastoffen der jeweiligen Lebensmittel herangezogen. Demnach ergeben sich beispielsweise für Knoblauch folgende Überlegungen:

Der Diallylsulfid-Gehalt von Knoblauch beträgt etwa 70 mg kg^{-1} [97]. Geht man von ähnlichen Einbauraten in Aromastoffe aus und berücksichtigt das Mengenverhältnis von Schwefel zu Selen von etwa 12000:1 in der Natur, entspräche dies einer potenziellen Diallylselenidkonzentration in der Größenordnung von ca. $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ bzw. einem Selengehalt von $4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Bei der Extraktion von 100 g Knoblauch und nachfolgendem Einengen des Extraktes auf 1 mL würde eine Selenkonzentration von 400 ng mL^{-1} ($= 400 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$) resultieren.

Anhand der Referenzsubstanz Dimethyldiselenid wurden die GC-AED-Messparameter zur Steigerung der Empfindlichkeit für Selenverbindungen optimiert.

Mit einer Nachweisgrenze von $0,3 \text{ pg s}^{-1}$, was bei einer Peakbreite von 5 s einer Absolutmenge von 1,5 pg entspricht, wurde der vom Hersteller angegebene Wert um mehr als den Faktor 10 unterschritten (**Tab. 2-3**). Bei einem Injektionsvolumen von 1 μL sind damit im Vergleich zu obiger Abschätzung noch 250-fach geringere Gehalte sicher zu quantifizieren. Damit waren die prinzipiellen messtechnischen Voraussetzungen zur Erfassung auch äußerst geringer Anteile an flüchtigen bzw. aromawirksamen Selenkomponenten in Nahrungsmitteln geschaffen.

Trotz Einsatz unterschiedlicher Extraktionsverfahren (**4.3.1**) und z.T. verhältnismäßig großer Mengen an Untersuchungsmaterial (100 bis 750 g) wurden in keinem der untersuchten Nahrungsmittel (Knoblauch, Brokkoli, Pfifferlinge, Meerrettich, Radieschen) flüchtige selenhaltige Verbindungen detektiert. Wiederfindungsraten bei Dotierung mit Dimethyldiselenid von 98 % (**4.3.1**) demonstrierten die prinzipielle Eignung des angewandten Verfahrens.

Selenide sind ähnlich den Sulfiden sehr reaktiv und bereiten aufgrund von Artefaktbildungen nicht nur bei der gaschromatographischen Bestimmung Probleme. Bereits während der Aufarbeitung können sie bei Kontakt mit Sauerstoff zu Selenoxiden oxidiert werden [85]. Selenole werden wie ihre schwefelhaltigen Analoga leicht zu Diseleniden oxidiert, welche unter Verlust von Selen wiederum Monoselenide bilden; Selenide können zudem mit Thiolen weiterreagieren [98]. Daneben sind die für Disulfide typischen Disproportionierungsreaktionen, die zu Sulfiden und Trisulfiden führen, bei Diseleniden ebenfalls denkbar.

Um mögliche Artefaktbildungen unter den gewählten Extraktions- bzw. Aufarbeitungsbedingungen abschätzen zu können, wurde Dimethyldiselenid in Wiederfindungsversuchen Knoblauchhomogenaten zudotiert. Hierbei entstanden zahlreiche selenhaltige Verbindungen, die mittels GC-AED neben dem zugesetzten Dimethyldiselenid detektiert wurden. Massenspektrometrisch wurden als Hauptkomponenten Dimethylselenylsulfid, Methylselenylallylsulfid, Dimethylselenyldisulfid und Methylselenylallyldisulfid identifiziert (**2.4**). Die Konzentrationen an Einzelstoffen werden durch derartige Reaktionen deutlich erniedrigt, was eventuell dazu führt, dass die Nachweisgrenzen der GC-AED Bestimmung unterschritten werden.

Der Nachweis selenhaltiger Aminosäuren als Vorstufen der gesuchten flüchtigen Verbindungen gelang bislang nur in Pflanzen, die auf Se-reichen Böden (Kesterson Reservoir, Kalifornien) [89] oder in Se-angereicherten Nährmedien [90] gewachsen waren. Sämtliche verfügbaren Veröffentlichungen zu flüchtigen selenhaltigen Verbindungen stammen von einer amerikanischen Arbeitsgruppe, deren Probenmaterial möglicherweise auf selenreichen Böden gezogen worden war.

Trotz der natürlichen Häufigkeit des Selens und dem Vorkommen in Cystein-analogen Aminosäuren kann von einem geringeren Einbau in flüchtige Verbindungen ausgegangen werden. So wird Selenocystein z.B. zur Synthese spezieller selenhaltiger Enzyme benötigt [86] und damit einem, dem Cystein-S-oxid analogen, Abbau zu flüchtigen selenhaltigen Verbindungen entzogen. Untersuchungen von BERTELSEN *et al.*, die in Brassicaceen nur Spuren der ebenfalls als Aromaprecursoren dienenden Glucosinolate nachweisen konnten, weisen ebenso in diese Richtung [99].

3.5.4 Zusammenfassung

Durch Optimierung der Messparameter wurden die Voraussetzungen geschaffen, um flüchtige selenhaltige Verbindungen mittels GC-AED hochempfindlich nachzuweisen. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nahrungsmitteln wurden jedoch keine flüchtigen Selenspezies detektiert. Wiederfindungsversuche mit Dimethyldiselenid in Knoblauchhomogenaten ließen auf eine hohe Reaktivität von Selenverbindungen schließen, wodurch die Konzentrationen der Einzelsubstanzen stark verringert werden können.

Ursache für das Fehlen flüchtiger selenhaltiger Aromastoffe in den untersuchten europäischen Lebensmitteln ist möglicherweise auch eine starke Abhängigkeit von der geographischen Herkunft bzw. der jeweiligen Bodenbeschaffenheit.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

4.1.1 Verwendete Basidiomyceten

Die untersuchten Basidiomyceten-Stämme wurden von der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen (CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures) in Baarn, der amerikanischen Sammlung (ATCC = American Type Culture Collection) in Rockville bzw. der französischen Sammlung (Collection Nationale de Culture de Microorganismes) in Paris bezogen [100,101].

Bjerkandera adusta (Willdenow : Fries) Karst. CBS 414.48; A. Hochberg Hervey

Pycnoporus cinnabarinus (Jacquin : Fries) Karst. CBS 353.63; ex angiosperm wood, Canada, M. K. Nobles

Pycnoporus cinnabarinus (Karst.) I-937

Nidula niveo-tomentosa (Henn.) Llyod ATCC 38357, ex soil under pteridium, W. A. Ayer 68041

Nidula niveo-tomentosa (Henn.) Llyod CBS 250.84, ex soil under pteridium, Canada, S. Flegler, det. H. J. Brodie

Nidula niveo-tomentosa, (Henn.) Lloyd CBS 380.80, ex soil under pteridium, Canada, P. LeClair

4.1.2 Verwendete Medien

Nr. 1 Standard-Nähr-Agar (SNA):

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹

Agar-Agar	20,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 2 Standard-Nähr-Lösung mit Vitamin B₁ (SNL-B₁) nach Sprecher [102]:

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid (Vit. B ₁)	2 mg L ⁻¹
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 3 Standard-Nähr-Lösung mit Hefeextrakt (SNL-Hefe):

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 4 PCI-Medium nach Gross et al. [20]:

Maltose-Monohydrat	10,0 g L ⁻¹
Diammoniumtartrat	0,182 g L ⁻¹
Hefeextrakt	0,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,2 g L ⁻¹
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1,32 mg L ⁻¹
MgSO ₄	0,25 g L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid (Vit. B ₁)	2,5 mg L ⁻¹

Nr. 5 PCI-Medium mit Ammoniumchlorid:

Ersatz der N-Quelle Diammoniumtartrat durch Ammoniumchlorid; ansonsten wie Medium Nr. 4.

NH₄Cl 0,102 g L⁻¹

Nr. 6 Sojapepton-Medium:

D(+)-Glucose-Monohydrat 30,0 g L⁻¹

Pepton aus Sojabohnenmehl 6,0 g L⁻¹

Hefeextrakt 1,5 g L⁻¹

KH₂PO₄ 2,5 g L⁻¹

MgSO₄ 0,5 g L⁻¹

CaCl₂ × 2 H₂O 73,5 mg L⁻¹

Spurenelementlösung 1,0 mL L⁻¹

pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH

Nr. 7 Sojapepton-Medium mit L-Phenylalanin-Zusatz

Wie Medium Nr. 6. Nach dem Autoklavieren Zusatz von

L-Phenylalanin 10 mmol L⁻¹

Nr. 8 Sojapepton-Medium mit ¹³C-markierter Glucose

Ersatz der Glucose durch ¹³C-markierte Glucose; ansonsten wie Medium Nr. 7.

1-¹³C-D(+)-Glucose 30 g L⁻¹

Nr. 9-12 Sojapepton-Medien mit teilweisem Ersatz der Glucose durch C₂- bzw. C₃-Bausteine

Hippursäure als Precursor; Reduktion des Glucose-Gehalts und Ersatz durch C₂- bzw. C₃-Bausteine; ansonsten wie Medium Nr. 6.

Hippursäure 0,36 g L⁻¹

D(+)-Glucose-Monohydrat 20,0 g L⁻¹ (100 mmol L⁻¹)

Natriumacetat-Trihydrat 13,6 g L⁻¹ (100 mmol L⁻¹)

Natriumpyruvat 11,0 g L⁻¹ (100 mmol L⁻¹)

Dinatriummalonat-Monohydrat 16,6 g L⁻¹ (100 mmol L⁻¹)

Dimethylmalonat 0,23 g L⁻¹ (2 mmol L⁻¹)

Dimethylmalonat wurde in zwei Portionen à 100 µL am 5. und 11. KT zugegeben.

L-Alanin 3,6 g L⁻¹ (40 mmol L⁻¹)

Nr. 13 Sojapepton-Medium mit Inhibitor und Dimethylmalonat

Zusatz von Diclofop-methyl und Dimethylmalonat; ansonsten wie Medium Nr. 7.

Diclofop-methyl 170 mg L⁻¹ (0,5 mmol L⁻¹)

Dimethylmalonat 2,64 g L⁻¹ (20 mmol L⁻¹)

Spurenelementlösung für Medien Nr. 1-3 und 5-13:

FeCl₃ 0,080 g L⁻¹

ZnSO₄ x 7 H₂O 0,090 g L⁻¹

CuSO₄ x 5 H₂O 0,005 g L⁻¹

MnSO₄ 0,027 g L⁻¹

Titriplex III 0,400 g L⁻¹

Nr. 14 Leatham-Medium, modifiziert [50,51]

D(+)-Glucose-Monohydrat 25,0 g L⁻¹

L-Glutaminsäure 2,5 g L⁻¹

D-Glucuronsäure 4,0 g L⁻¹

KH₂PO₄ 2,0 g L⁻¹

MgSO₄ x 7 H₂O 2,0 g L⁻¹

CaCl₂ x 2 H₂O 36,7 mg L⁻¹

MnSO₄ x H₂O 30,8 mg L⁻¹

ZnSO₄ x 7 H₂O 22,0 mg L⁻¹

Fe(NH₄)(SO₄)₂ x 6 H₂O 141,0 mg L⁻¹

CuSO₄ x 5 H₂O 0,784 mg L⁻¹

CoCl₂ x 6 H₂O 0,081 mg L⁻¹

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ x H₂O 0,094 mg L⁻¹

NiCl₂ x 6 H₂O 0,081 mg L⁻¹

SnCl₂ x 2 H₂O 0,038 mg L⁻¹

myo-Inosit 1,0 mg L⁻¹

Thiamin 1,0 mg L⁻¹

Pyridoxin-HCl 0,1 mg L⁻¹

Nicotinsäure	0,1 mg L ⁻¹
Ca-Pantothenat	0,1 mg L ⁻¹
p-Aminobenzoessäure	0,1 mg L ⁻¹
Riboflavin	0,1 mg L ⁻¹
Biotin	0,03 mg L ⁻¹
Folsäure	0,01 mg L ⁻¹
Vit. B ₁₂	0,01 mg L ⁻¹
pH-Einstellung auf pH 4,0 mit 1 M HCl	

Anmerkungen:

Der Zusatz von Thiaminhydrochlorid erfolgte nach dem Autoklavieren durch Zugabe einer sterilfiltrierten Stammlösung (2,0 bzw. 2,5 g L⁻¹).

L-Tryptophan, L-Kynurenin und L-Phenylalanin wurde getrennt und trocken autoklaviert oder in wenig Medium gelöst und sterilfiltriert zu den autoklavierten Medien gegeben.

Natriumacetat, Natriumpyruvat, Dinatriummalonat, Dinatriumsuccinat und L-Alanin wurden jeweils in dest. Wasser gelöst und nach Sterilfiltration zugegeben.

Diclofop-methyl sowie flüssige Precursoren wurden direkt zu den autoklavierten Medien hinzugegeben.

4.1.3 Verwendete Chemikalien

Tab. 4-1: Nährmedienbestandteile

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. Mikrobiol.	Merck	8342
Maltose-Monohydrat	90-95 %	Sigma	M 2250
L-Asparagin-Monohydrat	99-101 %	Merck	1565
Hefeextrakt	f. Mikrobiol	Merck	3753
Pepton aus Sojabohnenmehl (papainisch)	f. Mikrobiol	Merck	7212
Agar-Agar	f. Mikrobiol	Merck	1614

Tab. 4-1: Nährmedienbestandteile (Fortsetzung)

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
Diammoniumtartrat	99,6 %	Baker	10.12
L-Glutaminsäure	> 99 %	Fluka	49450
D-Glucuronsäure, Na-Salz	99 %	Sigma	G-9005
Thiaminhydrochlorid	≥ 99 %	Fluka	95160
p-Aminobenzoessäure	> 99 %	Fluka	06930
(+)Biotin	> 99 %	Fluka	14400
Ca-D-Pantothenat	> 99 %	Fluka	21210
Folsäure	> 97 %	Fluka	47620
myo-Inosit	> 99,5 %	Fluka	57569
Nicotinsäure	> 99,5 %	Fluka	72309
Pyridoxal-HCl	f. biochem.Zwecke	Merck	7523
Riboflavin	-	Dr. Marcus	031116
Vitamin B ₁₂	> 98 %	Fluka	95190
KH ₂ PO ₄	f. Mikrobiol	Merck	4871
MgSO ₄	Chem.rein DAB 7	Riedel-de Haen	13143
FeCl ₃	≥ 98 %	Fluka	44943
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	99,5-103 %	Fluka	96500
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	99 %	Riedel-de Haen	12849
MnSO ₄ x H ₂ O	> 98 %	Fluka	63555
Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	p. a.	Riedel-de Haen	31110
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	rein	Riedel-de Haen	12914
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O	> 99 %	Fluka	09878
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-de Haen	13613
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	> 98 %	Fluka	96470
NH ₄ Cl	> 99 %	Fluka	09702
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	≥ 99 %	Riedel-de Haen	31307
Titriplex III	≥ 99 %	Merck	8418

Tab. 4-2: Precursoren und sonstige Chemikalien für die Mikrobiologie

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
L-Phenylalanin	≥98 %	Sigma	P-2126
1- ¹³ C]-L-Phenylalanin	99 at%	Promochem	CLM-762
2- ¹³ C]-L-Phenylalanin	99 at%	Promochem	CLM-1631
3- ¹³ C]-L-Phenylalanin	99 at%	Promochem	CLM-1053
L-Alanin	>99 %	Fluka	05130
1- ¹³ C-D-Glucose	99 at%	Chemotrade	-
Natriumacetat-Trihydrat	> 99 %, LM-Qual.	Merck	6265
Natriumpyruvat	> 99 %, Cell Culture	Sigma	P-5280
Dinatriummalonat-Monohydrat	> 99 %	Fluka	63411
Dimethylmalonat	97 %	Fluka	63380
Dinatriumsuccinat	> 99 %	Fluka	14170
Hippursäure	≥ 97 %	Fluka	53280
L-Kynurenin	H ₂ O-Gehalt 0,5 mol/mol	Sigma	K-8625
Benzoylessigsäureethylester	≥ 95 %	Fluka	12990
Diclofop-methyl	99,9 %	Riedel-de Haen	45442
Methylenblau-Lösung (Löffler)	f. Mikrobiol.	Merck	1287

Tab. 4-3: Chemikalien für Analytik und Synthese

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
Acetanhydrid	≥ 99,5 %	Fluka	45830
Acetylchlorid	puriss. p. a.	Fluka	00990
Aktivkohle	-	-	-
3- ¹³ C]-L-Alanin	99 at%	Promochem	CLM-117
Ammoniumchlorid	> 99 %	Fluka	09702
Bariumacetat	p. a.	Merck	1704
Benzaldehyd	-	Sigma	B-6259
Benzoessäure	≥ 99 %	Riedel-de Haen	33047
Benzoxazol	98 %	Aldrich	B1,170-2
Benzylbromid	98 %	Sigma	B 1012

Tab. 4-3: Chemikalien für Analytik und Synthese (Fortsetzung)

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid	GC-Qual.	Macherey & Nagel	70121
3-Brom-4-methoxybenzaldehyd	99 %	Aldrich	41,201-5
Butyllithium (in Hexan)	1,6 M	Fluka	20160
3-Chlorbenzaldehyd	97 %	Aldrich	C2,340-3
1,8-Cineol		Referenzsammlung	
(-)- β -Citronellol	≥ 99 %	Fluka	27483
Diazald	99 %	Aldrich	D2,800-0
Diisopropylamin	-	Sigma	D-3022
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	$\geq 99,5$ %	Fluka	40248
Dimethyldiselenid	98 %	Aldrich	32,850-2
Dimethylselenid	≥ 99 %	Fluka	54597
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	≥ 99 %	Fluka	71638
Dowex 50WX8	p. a.	Fluka	44504
D ₂ O	99,96 at%	MSD Isotopes	MD-1743
D ₂ SO ₄	99,96 at%	MSD Isotopes	
Eisessig	99-100 %	Baker	6152
Essigsäureanhydrid	$\geq 99,5$ %	Fluka	45830
Essigsäuremethylester	> 99 %	Fluka	46000
2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	≥ 99 %	Aldrich	E455-0
Ethylacetat	puriss., abs.	Fluka	45765
Ethylnicotinat		Referenzsammlung	
3-Fluor-4-methoxybenzaldehyd	99 %	Aldrich	15,558-6
2-Hydroxyacetophenon	≥ 98 %	Fluka	54150
4-Hydroxybenzaldehyd		Sigma	H-5630
3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-propansäure	98 %	Lancaster	6267
4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on (Himbeerketon)	99 %	Aldrich	17,851-9
3-(4-Hydroxyphenyl)-propansäure	>99 %	Merck	814101
Imidazol	$\geq 99,5$ %	Fluka	56750
Kaliumhydroxid	p. a.	Riedel-de Haen	30603

Tab. 4-3: Chemikalien für Analytik und Synthese (Fortsetzung)

Bezeichnung	Qualität	Hersteller	Bestell-Nr.
Kieselgel 60 für die Säulen-Chromatographie (70-230 mesh)	-	Merck	1.07734
Lewatit OC 1064	Vers. Prod.	Bayer AG	-
Malonyl-CoA, Li-Salz	93 %	Sigma	M-4263
Methylantranilat		Referenzsammlung	
3-Methyl-4-methoxybenzaldehyd	~ 99 %	Fluka	65780
2-Methoxybenzaldehyd	≥ 98 %	Fluka	64770
3-Methoxybenzaldehyd	~ 97 %	Fluka	64780
4-Methoxybenzaldehyd	≥ 98 %	Fluka	10440
Natriumborhydrid	> 97 %	Fluka	71320
Natriumchlorid	reinst	Riedel-de Haen	13423
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	≥ 99 %	Fluka	71502
Natriumhydroxid	p.a.	Merck	
Natriumsulfat	reinst	Riedel-de Haen	13464
Salzsäure, konz.	reinst	Riedel-de Haen	07102
Triethylamin	z. S.	Merck	808352
Trimethylpyrazin		Referenzsammlung	
Undecansäuremethylester	99 %	Aldrich	29,941-3
Vanillin	≥ 99 %	Fluka	94750

4.1.4 Lösungsmittel

Tab. 4-4: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Herkunft
Dichlormethan	redest.	HL
Diethylether	redest.	HL
Ethylacetat	redest.	HL
Butylacetat	redest.	HL
Ethanol	redest.	HL
Methanol	redest.	HL

Tab. 4-4: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Herkunft
Pentan	redest.	HL
n-Propanol	redest.	HL
Tetrahydrofuran	redest.	HL

4.1.5 Gase

Tab. 4-5: Verwendete Gase

Gas	Verwendung	Qualität	Lieferant
Helium	Trärgas GC-AED / -MS	5.0	Linde
Wasserstoff	Trärgas / Detektorgas / Reaktantgas GC-AED	5.0	Linde
Stickstoff	Trärgas / Spektrometer-spülung GC-AED	5.0	Linde
Sauerstoff	Reaktantgas GC-AED	5.0	Linde
Methan/Stickstoff	Reaktantgas GC-AED	5.0	Linde
Luft	Detektorgas / Hilfsgas	5.0	Kompressor ^(a)
Argon	Schutzgas f. Synthesen	5.0	Linde

^(a) Außenluft wurde über einen Staubfilter angesaugt und durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor komprimiert. Nach anschließender Trocknung an einem Wasserabscheider und an einer mit Blaugel gefüllten Patrone wurde die Luft für die GC verwendet.

4.1.6 Geräte

Steriles Arbeiten:

Sterile Werkbank, Laminar-Flow-Modul 821/825, Stangl Reinraum- und Prozesstechnik

Sterile Werkbank Clean Air, W. H. Mahl, Kaarst
Vertikal-Autoklav VST 50/70 mit Dampfgenerator, Zirbus-Apparatebau,
Osterode/Harz

Kultivierung:

Tisch-Rundschüttler mit Inkubationshaube, ausgestattet mit 3 Leuchtstofflampen
(Eigenbau), Certomat, B. Braun AG, Melsungen
UVA (TL 44 D 25 / 09 N), Solariumröhre mit Strahlungs-Maximum bei 350 nm,
Strahlungs-Fluss (315-400 nm): 3,2 W, Philips
Tisch-Rundschüttler mit Inkubationshaube, Infors GmbH, CH-Bottmingen
Multitron-Schüttelmaschine, Infors GmbH, CH-Bottmingen
Umlaufkühler F 1000, Julabo, Seelbach/Schwarzwald
Kryothermostat, B. Braun AG, Melsungen
Ultra-Turrax TP 18-10, IKA Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau
Potter IK-KW 15, IKA Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau
Brutschrank BE 500, Memmert, Schwabach
Erlenmeyerkolben (200 mL, 300 mL) aus DURAN[®]-Glas, Schott, []

Sonstiges:

Lichtmikroskop Will H-500, Hund GmbH, Wetzlar
Vakuumfiltrationsapparatur Sartorius, Göttingen
Rundfilter Nr. 616, Macherey & Nagel, Düren
Sterilfilter 0,2 µm, Celluloseacetatmembran, Nalge Nunc Int., USA-Rochester
Varifuge 20 RS mit Rotoren HF 22.50 und FF 14.290, Heraeus, Osterode/Harz
Polypropylen-Zentrifugenbecher (250 mL)
Teflon-Zentrifugenbecher (250 mL), Nalge Nunc Int., USA-Rochester
Polycarbonat-Zentrifugenbecher (50 mL), Nalge Nunc Int., USA-Rochester
Tischzentrifuge Piccolo, Heraeus-Christ, Osterode/Harz
Vakuumzentrifugalverdampfer mit Kühlfalle, Jouan; Vakuumpumpe, Edwards, UK-
Crawley Sussex
Rotationsverdampfer, Büchi, CH-Flawil
Vigreux Kolonne
Kolbenhubpipetten (10 µL bis max. 5 mL), Eppendorf, Hamburg

pH-Meter Calimatic 761 mit Einstabmesskette, Knick, Berlin

Rührwerkskugelmühle DYNO-Mill Typ KDL mit 150 mL- und 650 mL-Mahlbehälter,
Willy A. Bachofen AG, CH-Basel

Glasperlen 0,5 mm Ø, Braun Biotech, Melsungen

Kühlschrank

Gefrierschrank

4.2 Mikrobiologie

4.2.1 Stammhaltung, Kulturführung und –kontrolle und Inokulum- Präparation

Stammhaltung:

Von jedem Stamm wurden je zwei Kulturen in Schrägagarröhrchen und Petrischalen als Stammkultur gehalten. Als Medium diente ein Standard-Nähr-Agar (SNA). Röhrchen und Platten wurden mit gut bewachsenen, nicht kontaminierten Stücken (ca. 0,5 - 1 cm²) von Agarplatten-Vorkulturen beimpft. Nach unterschiedlich langen Anwuchsphasen im Brutschrank bei 27 °C wurden die gut bewachsenen Kulturen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Eine Überimpfung auf frische Agarmedien erfolgte alle 6 Monate.

Inokulieren der 1. Vorkultur (SNL-B₁):

Zunächst wurden gut bewachsene Agarstücke der Stammkultur in 100 mL SNL-B₁ Medium überführt. Die Kultur wurde 1-3 Tage ohne Schütteln bei RT gelagert, bis deutlich Hyphen aus dem Agarstück wuchsen. Anschließend wurden die Kulturen mit einem Ultra-Turrax (Stufe 6, 30 s) homogenisiert und bei 24 °C und 180 U min⁻¹ kultiviert. Die nach ca. 1-2 Wochen gut bewachsenen Kulturen dienten dann über einen Zeitraum von bis zu 5 Wochen zur Inokulierung für die 2. Vorkultur.

Inokulieren der 2. Vorkultur (SNL-Hefe):

10 mL der frisch homogenisierten (s. o.) 1. Vorkultur wurden in Kolben (300 mL) mit 100 mL SNL-Hefe Medium pipettiert. Diese 2. Vorkultur wurde 9 bis 12 Tage bei

24 °C und 180 U min⁻¹ unter UV-Belichtung (14 h hell, 10 h dunkel) kultiviert und diente dann nach erneuter Homogenisation (s.o.) zur Inokulierung der experimentellen Kulturen.

Inokulieren der experimentellen Kulturen:

Die experimentellen Kulturen wurden (wenn nicht anders angegeben) mit 10 mL der 2. Vorkultur in 300 mL Erlenmeyerkolben, die 100 mL Nährlösung enthielten, beimpft. Alle Versuche wurden grundsätzlich als Doppelbestimmung aus dem gleichen Inokulum ausgeführt und nur bei vergleichbaren quantitativen Ergebnissen zur Auswertung herangezogen.

Die Kultivierung von *Nidula niveo-tomentosa* erfolgte bei 24 °C und 180 U min⁻¹ unter UV-Belichtung (14 h hell, 10 h dunkel). Die Kulturen von *Pycnoporus cinnabarinus* wurden bei 30 °C mit 200 U min⁻¹ geschüttelt.

4.2.2 Bestimmung einiger Kulturparameter

pH-Wert:

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde sofort nach Probenahme mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter bestimmt.

Glucosegehalt:

Eine orientierende Bestimmung der Glucosekonzentration in den Kulturmedien erfolgte direkt nach der Probenahme mit Glucoseteststreifen, Diabur Test 5000 (Boehringer, Mannheim).

Biotrockenmasse:

Ein definiertes Medienvolumen wurde über ein tariertes Rundfilter gesaugt und mit dest. Wasser nachgewaschen. Rundfilter und Mycel wurden zusammen getrocknet (103 °C, 12 h) und die Biotrockenmasse durch Differenzwägung des abgekühlten Rundfilters bestimmt.

Prüfung auf Kontaminationen:

Die Prüfung auf Kontaminationen erfolgte durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen der Kulturen.

Prüfung auf Lebensfähigkeit:

Ein Stück eines Pellets wurde mit Methyleneblau-Lösung angefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Methyleneblau ist ein Redox-Indikator, der sich leicht als Wasserstoff-Akzeptor betätigt [85]. Lebende Zellen übertragen Wasserstoff und überführen Methyleneblau dadurch in die Leukoform; es kommt zu einer Entfärbung.

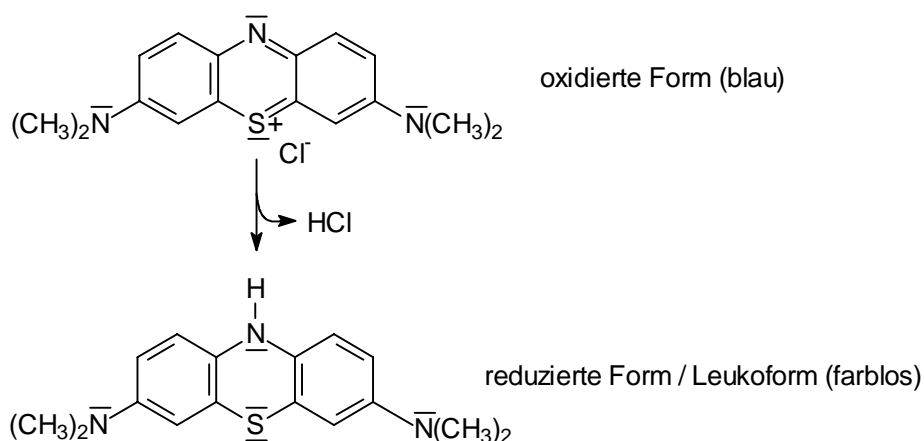


Abb. 4-1: Oxidierte und reduzierte Form von Methyleneblau

4.2.3 *In situ* Adsorption von Methylantranilat aus Kulturen von *P. cinnabarinus*

Die Kultivierung erfolgte in PCI-Medium mit NH_4Cl unter Zusatz von 1 g 100 mL^{-1} Lewatit OC 1064. Am 6. KT wurde das Lewatit zusammen mit dem Pilzmycel abfiltriert, gewaschen und anschließend mit je 10 mL Methanol und Ethylacetat sowie 20 mL Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v) eluiert. Das Medium wurde wie gewohnt mit Pentan/Diethylether extrahiert. Die Extrakte wurden an der Vigreux-Kolonne bei 40°C eingeeengt, mit Undecansäuremethylester als internem Standard versetzt und mittels GC-AED analysiert.

4.2.4 Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase und gleichzeitiger Zusatz von Precursoren

Die Kultivierung erfolgte in Sojapepton-Medium mit 10 mmol L^{-1} L-Phenylalanin und $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Diclofop-methyl (6. KT) bzw. 20 mmol L^{-1} Dimethylmalonat als Precursor. Probenahme am 0., 6., 9., 12., 15. und 19. KT.

4.2.5 Gewinnung von Enzymrohextrakten

Der Zellaufschluss erfolgte in Natriumphosphat-Puffer ($0,1 \text{ M}$, pH 7,5) im Eisbad mit einem Potter. Die Enzymrohextrakte wurden ohne weitere Aufreinigung mit der Precursorlösung versetzt und bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ über 30, 60 bzw. 180 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 M NaOH abgebrochen, der Extrakt mit 2 M HCl angesäuert und die entstehenden freien Säuren mit Ethylacetat extrahiert.

Als Precursoren wurden eingesetzt: Benzoessäure, Hippursäure, 3-Hydroxy-3-phenylpropansäureethylester, Benzoylessigsäureethylester, Malonyl-CoA

4.3 Isolierung flüchtiger Verbindungen

4.3.1 Aromaextrakte aus Lebensmitteln

Aufarbeitung unter Methanol-Inhibierung

250-500 g Untersuchungsmaterial wurden grob zerkleinert und im Mixer mit 300 mL kaltem Methanol homogenisiert. Das Homogenat wurde in Teflon-Zentrifugenbecher überführt und in einer vorgekühlten Zentrifuge 20 min bei $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 4500 U min^{-1} (3200 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5%iger NaCl-Lösung (w/v) auf ein Volumen von ca. 1 L verdünnt. 250 mL Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v) wurden in einem 500-mL-Rundkolben vorgelegt, die Extraktionsapparatur mit Kühler aufgesetzt und bei $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbadtemperatur 16-24 h extrahiert.

Nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde der Extrakt an einer Vigreux-Kolonnen bei $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ auf ca. 2-4 mL eingengt.

Direkte Extraktion mit Pentan/Diethylether

Das Untersuchungsmaterial (100-750 g) wurde nach mechanischer Zerkleinerung (Messer, Reibe) in einem Labormixer homogenisiert. Die Extraktion des Homogenats erfolgte durch Übersichten mit Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v) und Rühren mit einem KPG-Rührer über Nacht. Das Lösungsmittelgemisch wurde dekantiert, über Na_2SO_4 getrocknet und an einer Vigreux-Kolonne bei 40 °C Wasserbadtemperatur eingeeengt.

Wiederfindungsbestimmungen für selenhaltige Verbindungen

in Wasser

250 g Knoblauch enthalten bei einem Wasseranteil von 64 % [52] 160 g Wasser. Dementsprechend wurden 160 mL Wasser mit 19,38 mg Dimethyldiselenid (\equiv 16,28 mg Selen) versetzt und mit 500 mL Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v) im Rundkolben im Eisbad über Nacht extrahiert.

Die Wiederfindungsrate betrug 97,9 %.

in Knoblauchhomogenat

100 g Knoblauch wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und vor der Extraktion mit 19,38 mg Dimethyldiselenid (\equiv 16,28 mg Selen) versetzt. Der Extrakt wurde auf 4 mL Endvolumen eingeeengt und der GC-AED- bzw. GC-MS-Analytik zugeführt.

Statische Headspace [53]

6 g Knoblauch wurden mit einem Mörser zerkleinert und unter Zugabe von 13 mL H_2O und 5 g Na_2SO_4 in ein 20 mL-Probengläschen mit Schraubverschluss überführt. Nach 45-minütigem Erwärmen im Trockenschrank bei 90 °C wurde mit einer gasdichten Spritze 1 mL aus dem Dampfraum entnommen und direkt in die GC-AED injiziert.

Dynamische Headspace

Etwa 200-250 g pflanzliches Material wurden im Mörser zerkleinert und in einen Witt'schen Topf überführt. Über den Hahn am Deckel wurde N_2 (1 bar) zugeführt. Der Abgasstrom wurde über ein am seitlichen Ausgang angebrachtes und mit ca. 10 g Lewatit OC 1064 gefülltes Adsorberrohr geleitet. Nach 20 h „Extraktion“ wurde mit 60 mL Pentan/Dichlormethan, 30 mL Pentan und 30 mL Diethylether desorbiert und

die vereinigten organischen Phasen nach Trocknung über Na_2SO_4 an einer Vigreux-Kolonne bei 40 °C-Badtemperatur eingengt.

4.3.2 Isolierung flüchtiger Verbindungen aus den Kulturmedien

Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v):

Zunächst wurde die Biomasse durch Zentrifugation abgetrennt (4000 g, 4 °C, 30 min, Polypropylenbecher (250 mL)). Der Überstand wurde abdekantiert, ein definiertes Volumen entnommen und mit ges. NaHCO_3 -Lösung auf pH 7 bzw. mit 1 M HCl auf pH 1,5 eingestellt. Im Scheidetrichter wurde anschließend jeweils mit 3 x 50 mL des Lösungsmittels extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet (4 °C, über Nacht) und an einer Vigreux-Kolonne bei 40 °C Badtemperatur und Normaldruck auf ca. 1 mL eingengt. Die Extrakte wurden in Probenfläschchen mit Schraubverschluss überführt und nach Zusatz einer definierten Menge Undecansäuremethylester als internem Standard bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert.

Die Extrakte aus dem angesäuerten Medium wurden vor der gaschromatographischen Untersuchung mit Diazomethan methyliert (4.5.1).

Die Quantifizierungen erfolgten unkorrigiert in Bezug auf den internen Standard.

Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat:

Die Extraktion erfolgte entsprechend der Extraktion mit Pentan/Diethylether. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert (40 °C, 230 mbar)

Flüssig/Flüssig-Mikro-Extraktion mit Ethylacetat:

Kleine Volumina der Kulturlösungen (2-10 mL) wurden zunächst von der Biomasse befreit (Tischzentrifuge). 200 µL des Kulturmediums wurden in 4 mL Probenfläschchen mit Kochsalz gesättigt und mit 1 mL Ethylacetat überschichtet. Nach 1-minütigem Schütteln wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation

beschleunigt und die organische Phase ohne weitere Behandlung direkt der GC-Analytik zugeführt.

Flüssig/Flüssig-Extraktionen zur Bestimmung organischer Säuren:

Zur Isolierung der sauren Fraktion wurden die extrahierten Kulturmedien aus den Ansätzen zur Isolierung der neutralen flüchtigen Bestandteile mit Salzsäure auf pH 1,5 eingestellt und erneut mit den entsprechenden Lösungsmitteln extrahiert.

Kontinuierliche Flüssig/Flüssig-Extraktion:

Das Medium wurde in einen Perforator gefüllt und mit 5%iger NaCl-Lösung auf ein Volumen von ca. 1 L verdünnt. 250 mL Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v) wurden in einem 500-mL-Rundkolben vorgelegt, die Extraktionsapparatur mit Kühler aufgesetzt und bei 40 °C Wasserbadtemperatur 16-24 h extrahiert.

Der Extrakt wurde über Na₂SO₄ getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C eingeeengt.

4.3.3 Isolierung flüchtiger Verbindungen aus dem Pilzmycel

Zur Isolierung flüchtiger Metabolite aus dem Pilzmycel erfolgte zunächst der Zellaufschluss in einer Rührwerkskugelmühle. In einem 150 mL-Mahlbehälter wurde das Mycel mit ca. 90 mL Glasperlen sowie 60 mL Methanol versetzt und auf Stufe 4 bei -8 °C 15-30 min zermahlen. Der Aufschluss wurde von den Glasperlen abdekantiert und durch Zentrifugation (40000 g, 20 min, 1 °C, Polycarbonatbecher (50 mL)) von Mycelresten befreit. Nach Verdünnen des Methanol-Extraktes mit 5%iger NaCl-Lösung (w/v) wurde er der kontinuierlichen Flüssig/Flüssig-Extraktion (4.3.2) zugeführt.

4.4. Analytik

4.4.1 Kapillar-Gaschromatographie - Atomemissionsdetektion (GC-AED)

Konfiguration:

Hewlett Packard Gaschromatograph HP 6890 gekoppelt mit einem Hewlett Packard Atomic Emission Detector HP G2350.

Injektor:	Kaltaufgabesystem KAS 4 (Gerstel, Mülheim/Ruhr)
Cavity:	300 °C bzw. 250 °C
Xferline:	300 °C bzw. 250 °C
Säule:	Optima 5-MS: 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Macherey & Nagel, Düren) bzw. DB Wax, 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm (J&W, USA)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 5 °C min ⁻¹ - 280 °C (10 min) bzw. 40 °C (3 min) - 5 °C min ⁻¹ - 230 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: He = 20 psi Reaktantgase: H ₂ = 30 psi, O ₂ = 30 psi Spektrometerspülung: N ₂ = 0,5 L min ⁻¹
Auswertestation:	HP GC ChemStation A.04.05

Bestimmung der Nachweisgrenzen:

Die Nachweisgrenzen wurden mit folgenden Standardsubstanzen bestimmt:

- Trimethylpyrazin
- 1,8-Cineol
- Dimethylsulfid
- Dimethyldiselenid
- Benzylbromid
- 5-²H-Vanillin (**4.6.1**)
- 3-¹³C-L-Alanin (**4.5.2**)

Stammlösungen ca. 10 mg mL⁻¹ in Pentan/Diethylether (1+1,12, v/v)

Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000

Berechnung der Anteile an ^{13}C -markiertem Himbeeralkohol nach Zusatz von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin bzw. 1- ^{13}C -D(+)-Glucose

Voraussetzungen:

- Die Responsefaktoren sind für beide Isotope gleich.
- Das Acetyl-CoA stammt ausschließlich aus der Glucose, d. h. durchschnittlich trägt jedes Himbeeralkohol-Molekül eine Markierung.

Tab. 4-6: Anteile an ^{13}C -markiertem Himbeeralkohol nach Zusatz von 3- ^{13}C -L-Phenylalanin bzw. 1- ^{13}C -D(+)-Glucose zu Kulturen von *N. niveo-tomentosa*

	3- ^{13}C -L-Phenylalanin	1- ^{13}C -D(+)-Glucose
Fläche ^{12}C	4905,5	1190,9
Fläche ^{13}C	243,4	59,8
Fläche ^{12}C : Fläche ^{13}C	20 : 1	20 : 1
^{12}C : ^{13}C	9 : 1	9 : 1
Anteil ^{13}C-HA	45 %	45 %

„Compound independent calibration“ für Organohalogenverbindungen

Standardlösungen in Methanol:

3-Chlorbenzaldehyd	0,0356 mg mL ⁻¹
3-Brom-4-methoxybenzaldehyd	0,0360 mg mL ⁻¹

Die Standardlösungen wurden jeweils drei mal injiziert (1 μL) und mit den Messungen eine „compound independent calibration“ durchgeführt. Dabei werden automatisch die Responsefaktoren in ng und nmol berechnet.

Tab. 4-7: Responsefaktoren für Kohlenstoff, Wasserstoff, Chlor, Brom und Sauerstoff nach Kalibrierung mit 3-Chlorbenzaldehyd und 3-Brom-4-methoxybenzaldehyd

	C 496^a	H 486^a	Cl 479^a	Br 478^a	O 171^a
ngRespFact	9,56	181,74	32,09	28,74	9,58
nmolRespFact	114,82	183,19	1137,70	2296,44	153,21

^a = Ziffern entsprechen den Bezeichnungen in den „recipes“ (≡ Messwellenlängen, gerundet)

Anhand dieser CIC-Tabelle wurden die Elementverhältnisse unbekannter Organohalogenverbindungen berechnet. Da der Basidiomycet *Bjerkandera adusta* bekanntermaßen Anisyllderivate synthetisiert, wurden die Summenformeln für C₈-Verbindungen berechnet.

Tab. 4-8: Anhand der CIC-Daten berechnete Elementverhältnisse halogenhaltiger Verbindungen in Kulturen von *B. adusta*

Retentionszeit	C 496^a	H 486^a	Cl 479^a	Br 478^a	O 171^a	Summenformel
31.967	1	1.058	0.173		0.129	C ₈ H _{8.5} Cl _{1.4} O
34.898	1	1.242	0.092		0.121	C ₈ H ₁₀ Cl _{0.7} O
35.458	1	0.835	0.106	0.120	0.125	C ₈ H _{6.7} Cl _{0.8} BrO
38.193	1	0.954		0.102	0.125	C ₈ H _{7.6} Br _{0.8} O
38.911	1	0.858		0.137	0.034	C ₈ H _{6.9} Br _{1.1} O _{0.3}
39.435	1	1.222		0.030	0.055	C ₈ H _{9.8} Br _{0.2} O _{0.4}
41.648	1	1.043	0.071		0.065	C ₈ H _{8.3} Cl _{0.6} O _{0.5}
45.976	1	0.996		0.079	0.098	C ₈ H _{8.0} Br _{0.6} O _{0.8}
47.752	1	0.932		0.094	0.060	C ₈ H _{7.5} Br _{0.8} O _{0.5}

^a = Ziffern entsprechen den Bezeichnungen in den „Rezepten“ (≡ Messwellenlängen, gerundet)

4.4.2 Kapillar-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Konfiguration 1:

Gaschromatograph:	HRGC 5300 Mega Series (Carlo Erba)
Injektion:	1 μL splitless (1 min)
Injektor:	split/splitless, 230 °C
Detektor:	FID, 260 °C
Säule:	Optima 5-MS fused silica Kapillarsäule: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Macherey & Nagel, Düren)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 5 °C min^{-1} - 280 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: H_2 = 3,0 mL min^{-1} (40 °C) FID: H_2 = 50 kPa, Luft = 100 kPa
Empfindlichkeit:	Elektrometer: Range = 0, Atten. = 7 Integrator: Atten. = 6
Datenaufnahme:	Chrom Card Version 1.19 (CE Instruments)

Konfiguration 2:

Gaschromatograph:	Fisons Series 8000 (Fisons bzw. Thermoquest,)
Injektion:	1 μL on-column
Detektor:	FID, 270 °C
Säule:	Carbowax (CW 20 M) fused silica Kapillarsäule: 25 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Leupold, Weihenstephan)
Vorsäule:	CW 20 M deaktiviert: 3 m x 0,32 mm (Chromatographieservice, Langerwehe)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 5 °C min^{-1} - 230 °C (20 min)
Gase:	Trärgas: H_2 = 3,7 mL min^{-1} (40 °C) FID: H_2 = 50 kPa, Luft = 100 kPa
Empfindlichkeit:	Elektrometer: Range = 0, Atten. = 7 Integrator: Atten. = 6

4.4.3 Kapillar-Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS)

Konfiguration 1:

Gaschromatograph:	HP 5890 Serie II (Hewlett Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer:	HP MS 5989 A Quadrupol (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektion:	1 μ L on-column
Ionenquelle:	200 °C
Interface:	230 °C
Quadrupol-Massenfilter:	100 °C
Ionisierungsenergie:	70 eV
Säule:	Optima 5-MS fused silica Kapillarsäule: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Macherey & Nagel, Düren)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 5 °C min ⁻¹ - 280 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: He = 50 kPa
Massenbereich:	33 - 300 (m/z)
Auswertestation:	MS HP-UX Chem Station mit Software B 06.01, Spektren Datenbank: Wiley, NBS54K (Nist), LMC

Konfiguration 2:

Gaschromatograph:	Fisons 8000 Series (Fisons bzw. Thermoquest,)
Injektion:	1 μ L on-column
Detektor:	Fisons Mass Selective Detector MD 800 Quadrupol (Fisons bzw. Thermoquest,)
Ionenquelle:	200 °C
Interface:	230 °C
Quadrupol-Massenfilter:	100 °C
Ionisierungsenergie:	70 eV
Säule:	Carbowax (CW 20 M) fused silica Kapillarsäule: 25 m x 0,32 mm x 0,25 μ m (Leupold, Weihenstephan)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 5 °C min ⁻¹ - 230 °C (20 min)
Gase:	Trärgas: He = 50 kPa
Massenbereich:	33 - 300 (m/z)
Auswertestation:	Mass Lab Version 1.3 mit Massenspektren-Datenbank

4.4.4 Berechnung von Kováts-Indices

Die Kováts-Indices wurden nach folgender Formel berechnet [60]:

$$KI = 100 N + 100 n \frac{(\log t'_A - \log t'_N)}{(\log t'_{N+n} - \log t'_N)}$$

mit N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert

n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans

A = Analyt

t' = relative Retentionszeit = Retentionszeit t - Totzeit t₀

4.5 Derivatisierungen für die GC

4.5.1 Methylierung organischer Säuren [103]

Die Methylierung von organischen Säuren erfolgte mittels Diazomethan in einer Apparatur nach WALKER *et al.* Das frisch aus Diazald hergestellte Diazomethan wurde mit einem Stickstoffstrom bis zur bleibenden Gelbfärbung durch die Probe geleitet. Um überschüssiges Diazomethan abzufangen, wurde den Proben ca. 100 µL Methanol zugesetzt.

4.5.2 Veresterung von L-Alanin mit n-Propanol/HCl zur Ermittlung der AED-Nachweisgrenze für ¹³C [104]

Zu 8 mL gekühltem n-Propanol wurden unter Rühren 2 mL Acetylchlorid getropft. 10 mg 3-¹³C-L-Alanin wurden in 10 mL 0,1 M HCl gelöst. Ein Aliquot von 1 mL wurde bei 70-80 °C (Sandbad) im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt, mit 800 µL des Reagenz versetzt und 60 min bei 100 °C (Sandbad) erhitzt. Das überschüssige Reagenz wurde bei 40-50 °C mit Stickstoff abgeblasen.

4.5.3 Silylierung mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)

20 µL des Pentan/Diethylether-Extraktes wurden mit 20 µL BSA-Lösung versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und direkt für die GC eingesetzt..

4.5.4 Acetylierung mit Acetanhydrid/Essigsäure

200 µL des Pentan/Diethylether-Extraktes wurden mit 20 µL Acetanhydrid und 50 µL Essigsäure versetzt und 48 h auf 60 °C (Trockenschrank) erhitzt [104]. Der Ansatz wurde direkt für die GC eingesetzt.

4.6 Synthesen

4.6.1 5-²H-Vanillin zur Ermittlung der AED-Nachweisgrenze für ²H [105]

106,3 mg (0,70 mmol) Vanillin wurden mit 0,5 mL D₂O und 0,09 mL Triethylamin versetzt und unter Stickstoffatmosphäre drei Tage bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt. Der Ansatz wurde mit 2 N HCl angesäuert und nach Ausschütteln mit drei mal 2 mL Dichlormethan am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der dunkelbraune Rückstand wurde unter Zusatz von Aktivkohle zweimal aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute ca. 70 %. Ca. 80-90 % Umsatz (GC-MS).

4.6.2 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol [106]

Die Darstellung erfolgte durch Reduktion von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on mit NaBH₄.

4.6.3 Ring-²H-L-Phenylalanin [107]

Zu 10 g L-Phenylalanin in 10 mL D₂O wurden unter Kühlung im Eisbad 10 g D₂SO₄ langsam zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde unter N₂ verschlossen und die Mischung 7 Tage bei RT gerührt. Die gelbe Lösung wurde langsam in 500 mL Eiswasser gegossen; nach Zugabe von 255 g Bariumacetat in 500 mL Wasser wurde der gebildete Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand auf eine Dowex 50-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Wasser gewaschen, das L-Phenylalanin mit 1 Säulenvolumen 2 N NH₄OH eluiert und das Eluat bei 40 °C eingengt. Nach Ausfällen mit Ethanol wurde aus Wasser-Ethanol (1+1, v/v) umkristallisiert.

4.6.4 3-Hydroxy-3-phenyl-propansäureethylester

3,1 mL (0,02 mol) Diisopropylamin (frisch destilliert) gelöst in 200 mL THF (abs.) wurden bei -78 °C (fl. Stickstoff/Butylacetat) unter Schutzgas-Atmosphäre langsam mit 13 mL (0,02 mol) einer 1,6 M Butyllithium-Lösung versetzt. Die Mischung wurde 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 1,76 g (0,02 mol) Essigsäureethylester und 2,12 g (0,02 mol) Benzaldehyd in THF (abs.) versetzt. Nach 2-stündigem Rühren wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mit verdünnter NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer (40 °C, Atmosphärendruck) eingengt.

4.6.5 3-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-propansäure [108]

Zu einer Lösung von 1,65 mL (11,8 mmol) Diisopropylamin in 20 mL THF (abs.) wurden bei -78 °C (fl. Stickstoff/Butylacetat) unter Schutzgas-Atmosphäre 7,0 mL (11,1 mmol) einer 1,6 M Butyllithium-Lösung getropft. Nach 30-minütigem Rühren wurden 0,254 mL (4,44 mmol) Essigsäure in 2 mL THF hinzugefügt und nach Erwärmen auf 0 °C weitere 30 min gerührt. Nach Abkühlung auf -78 °C wurden

0,50 g (3,7 mmol) 4-Methoxybenzaldehyd gelöst in 3 mL THF (abs.) zugegeben und nach langsamem Erwärmen auf RT weitere 16-24 h gerührt. Anschließend wurde mit 15%iger NaOH (w/v) alkalisch eingestellt, mit Diethylether gewaschen und nach Ansäuern mit 10%iger HCl (w/v) fünfmal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter Vakuum eingeeengt.

4.6.6 3-Hydroxy-3-(3-methoxyphenyl)-propansäure

0,50 g (3,7 mmol) 3-Methoxybenzaldehyd wurden entsprechend der Vorschrift in **4.6.5** umgesetzt.

4.6.7 3-Hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)-propansäure

1 g (7,4 mmol) 2-Methoxybenzaldehyd wurden entsprechend der Vorschrift in **4.6.5** umgesetzt.

4.7 Entsorgungshinweise

4.7.1 Biologisches Material

Die Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Medien wurden in den Ausguss gegeben, feste Bestandteile in den Laborabfall.

4.7.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch von Lösungsmitteln wurde durch die weitgehende Wiederverwendung nach destillativer Aufreinigung auf ein Minimum reduziert. Auf halogenierte

Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wieder verwertbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel.

Diese Lösungsmittel wurden ebenso wie Chemikalienreste der zentralen Entsorgung über die Universität Hannover zugeführt.

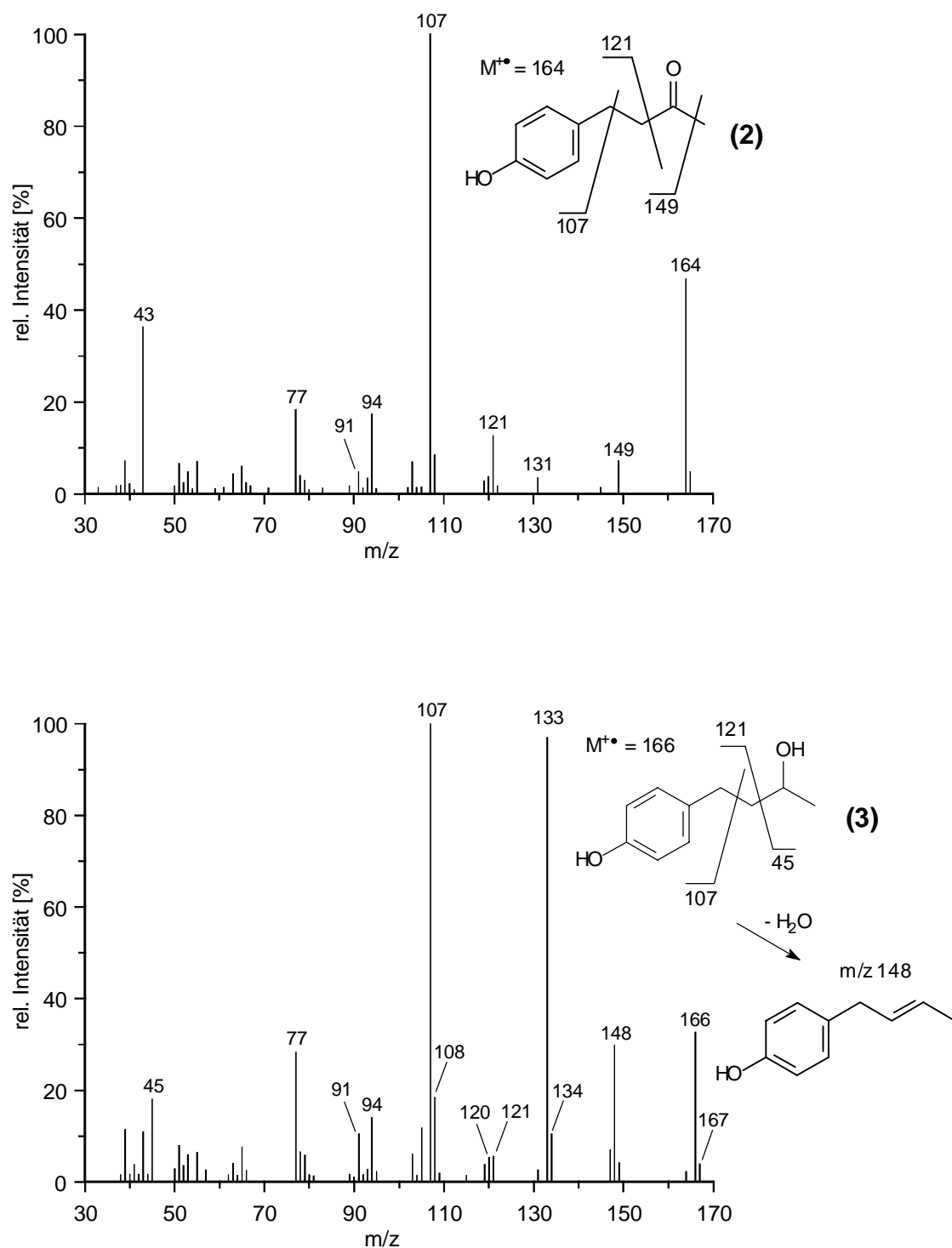


Abb. 5-1: Massenspektren von Himbeerketon (2) und Himbeeralkohol (3)

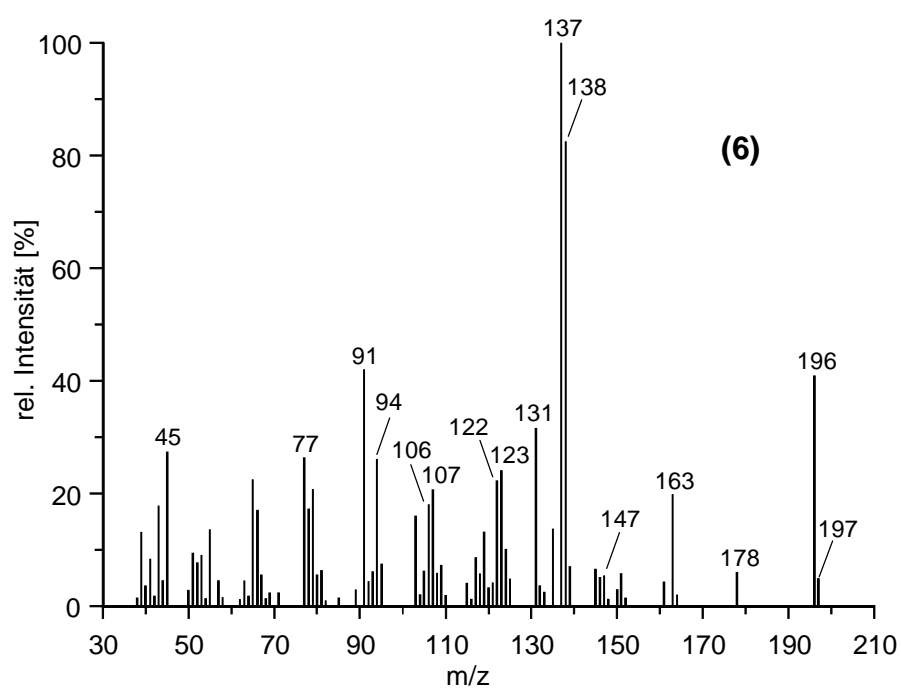
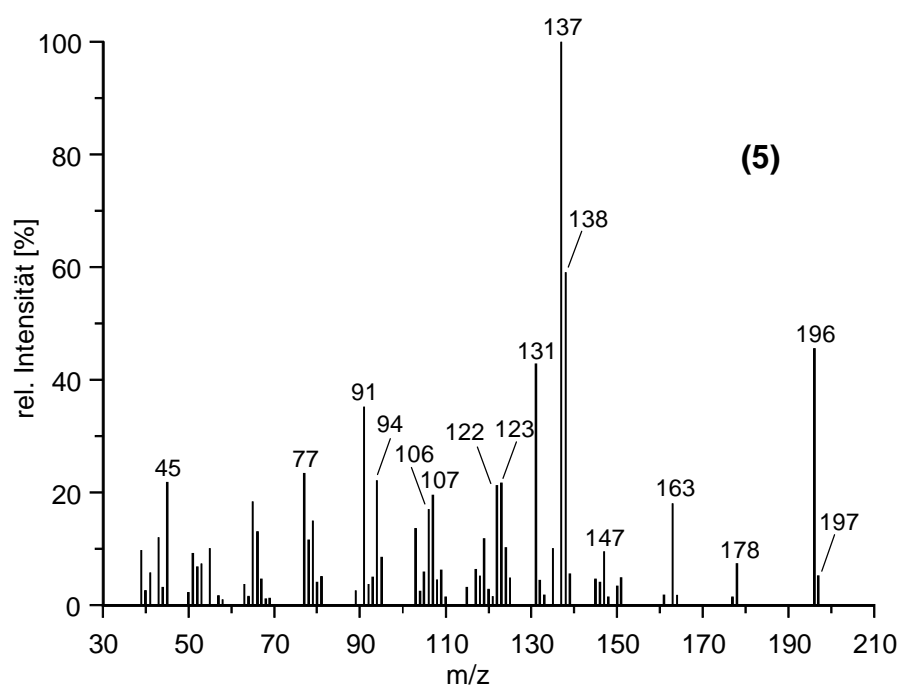


Abb 5-2: Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen **(5)** und **(6)** in Kulturen von *N. niveo-tomentosa*

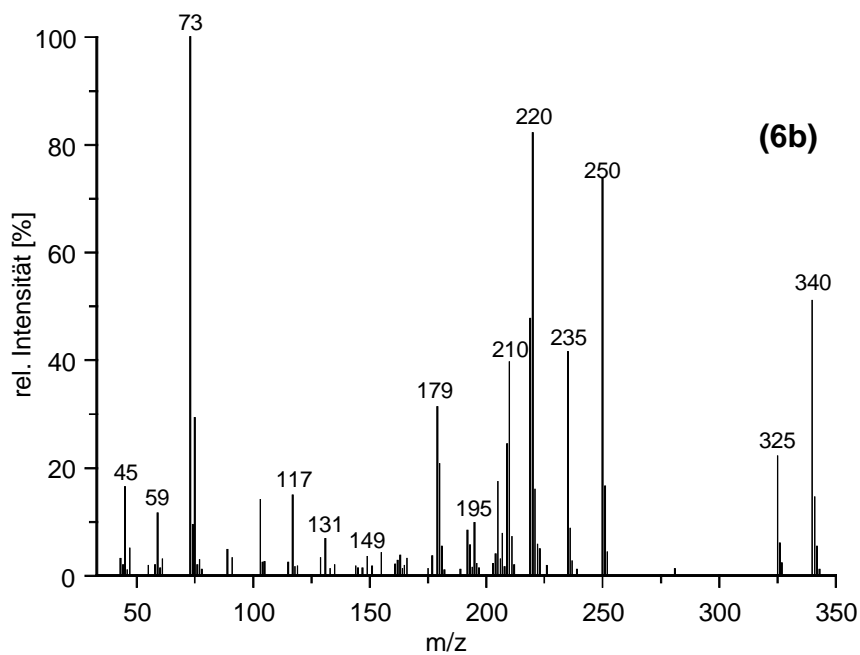
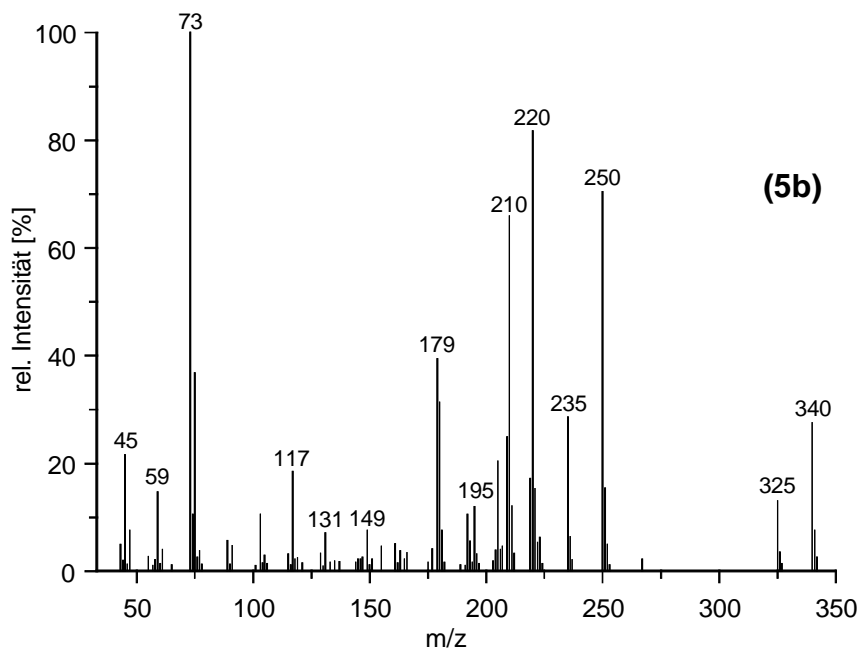


Abb. 5-3: Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen in Kulturen von *N. niveo-tomentosa* nach Derivatisierung mit BSA

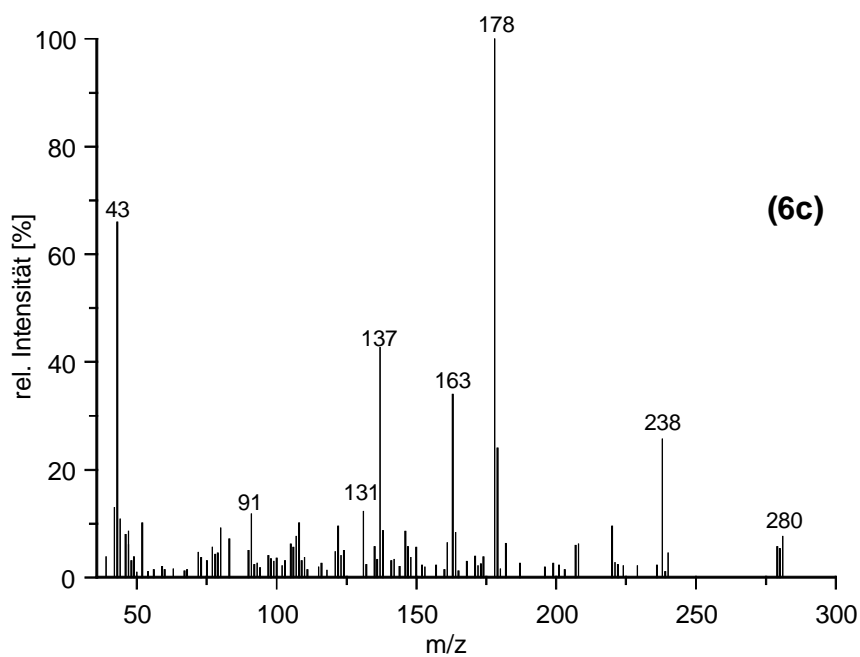
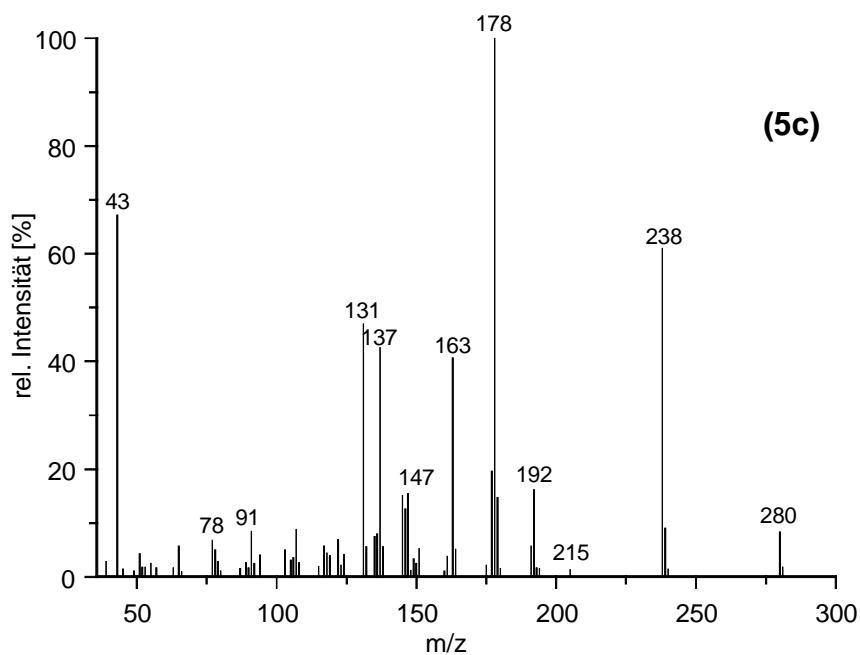


Abb. 5-4: Massenspektren zweier unbekannter Verbindungen in Kulturen von *N. niveo-tomentosa* nach Derivatisierung mit Acetanhydrid/Essigsäure

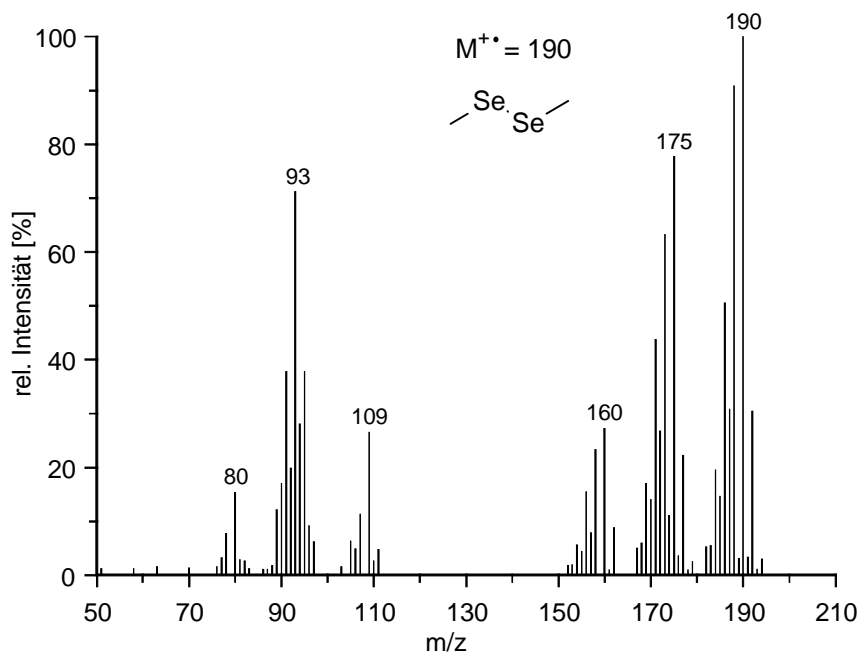


Abb. 5-5: Massenspektrum von Dimethyldiselenid

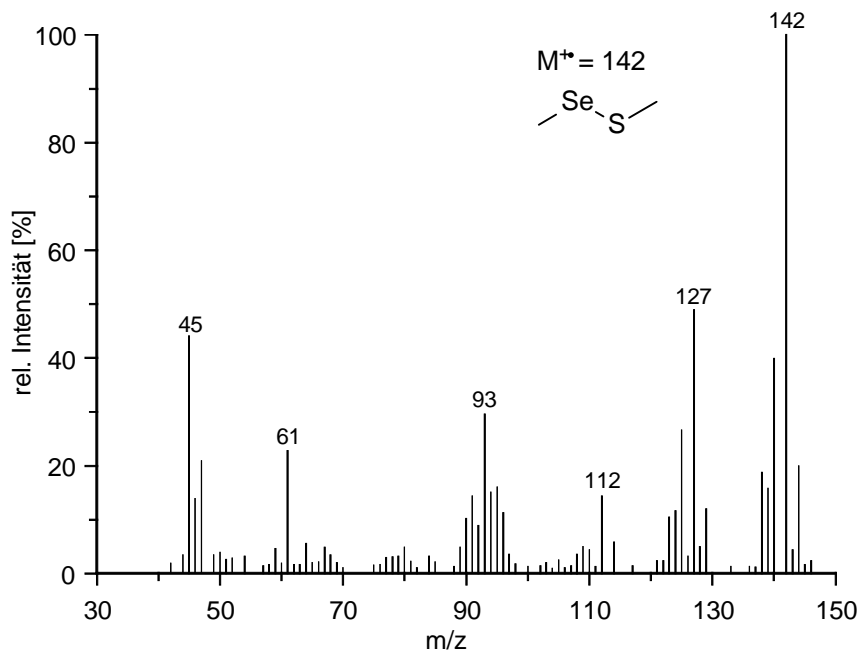


Abb. 5-6: Massenspektrum von Dimethylselenenylsulfid

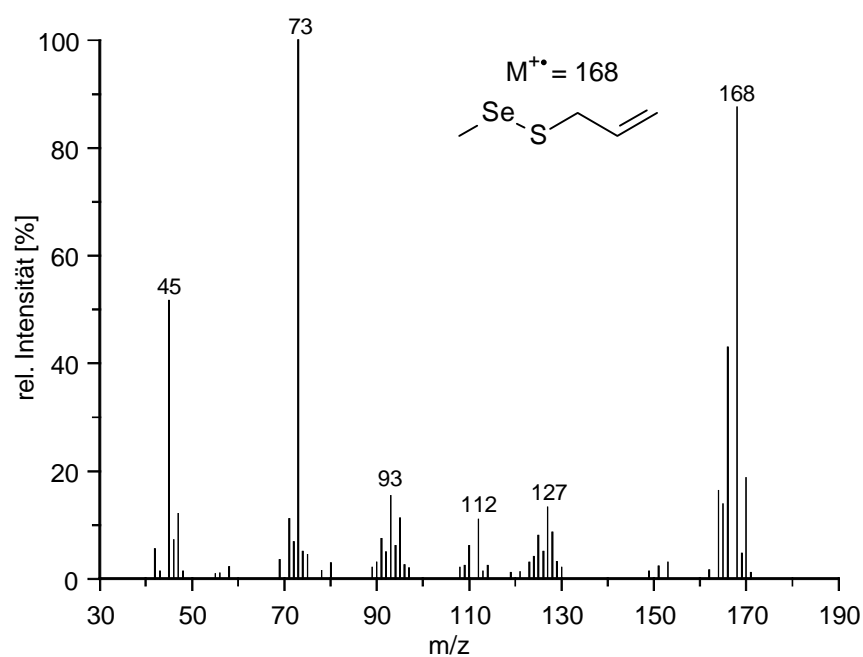


Abb. 5-7: Massenspektrum von Methylselenylallylsulfid

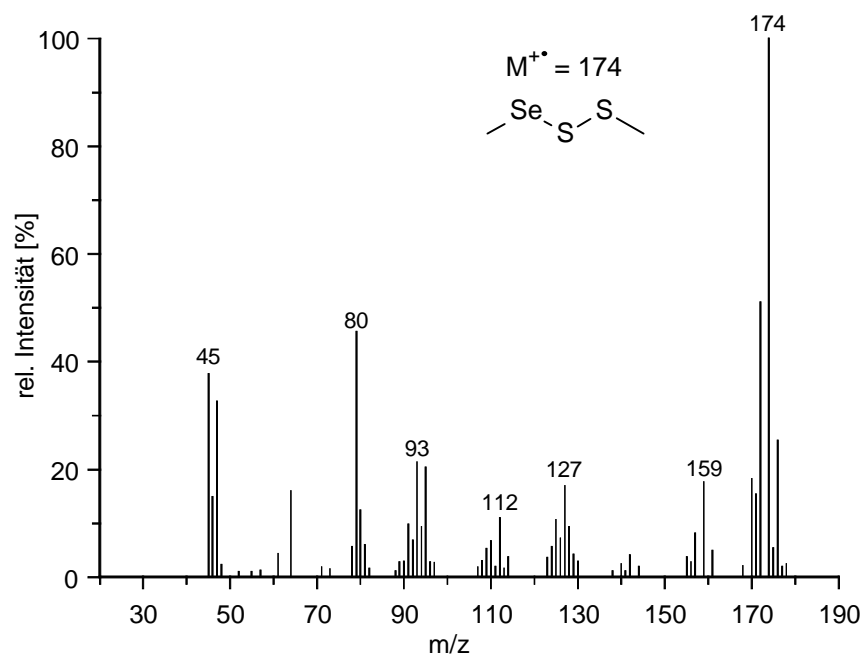


Abb. 5-8: Massenspektrum von Dimethylselenyldisulfid

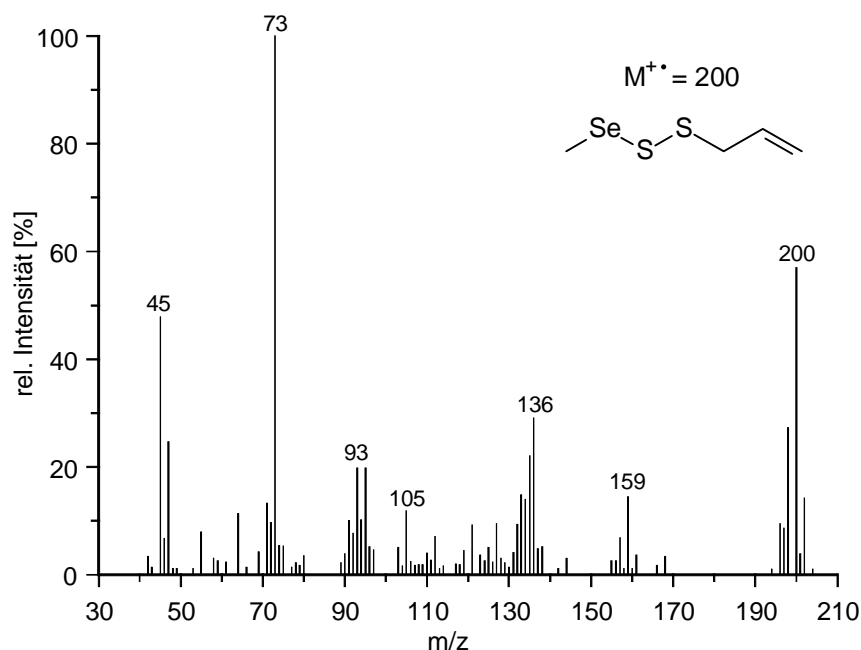


Abb. 5-9: Massenspektrum von Methylselenenylallyldisulfid

MS-Fragmentierungsmuster:

(Intensitäten < 1 % sind in den zugehörigen MS-Spektren nicht erkennbar)

Himbeeralkohol nach Zusatz von 1-¹³C-Glucose (**Abb. 2-30**):

m/z 45 (19,82 %), 46 (22,09 %), 107 (100,00 %), 108 (11,65 %), 120 (33,08 %), 121 (31,76 %), 122 (12,05 %), 133 (90,54 %), 134 (12,18 %), 135 (26,28 %), 148 (73,44 %), 150 (18,58 %), 166 (64,88 %), 167 (24,85 %), 168 (17,61 %)

Himbeeralkohol nach Zusatz von 3-¹³C-Phenylalanin (**Abb. 2-22**):

m/z 45 (30,98 %), 46 (1,28 %), 107 (100,00 %), 108 (92,86 %), 120 (7,31 %), 121 (7,53 %), 122 (4,04 %), 133 (98,6 %), 134 (81,13 %), 135 (8,38 %), 148 (37,05 %), 149 (27,93 %), 150 (3,07 %), 166 (34,82 %), 167 (31,25 %), 168 (3,40 %)

Himbeeralkohol, unmarkiert (**Abb. 5-1**):

m/z 45 (18,12 %), 46 (0,56 %), 107 (100,00 %), 108 (18,43 %), 120 (5,32 %), 121 (5,48 %), 122 (0,93 %), 133 (96,96 %), 134 (10,39 %), 135 (0,81 %), 148 (29,83 %), 149 (4,16 %), 150 (0,37 %), 166 (32,58 %), 167 (3,93 %), 168 (0,33 %)

Himbeerketon nach Zusatz von 1-¹³C-Glucose (**Abb. 2-30**):

m/z 43 (63,02 %), 44 (14,06%), 107 (100,00 %), 108 (20,90 %), 121 (7,03 %), 122 (23,37 %), 149 (11,43 %), 150 (3,00 %), 164 (53,64 %), 165 (23,99 %), 166 (4,77 %)

Himbeerketon nach Zusatz von 3-¹³C-Phenylalanin (**Abb. 2-22**):

m/z 43 (52,07 %), 44 (0 %), 107 (100,00 %), 108 (74,13 %), 121 (15,77 %), 122 (11,39 %), 149 (5,74 %), 150 (5,71 %), 164 (46,16 %), 165 (38,82 %), 166 (3,33 %)

Himbeerketon, unmarkiert (**Abb. 5-1**):

m/z 43 (36,47 %), 44 (0 %), 107 (100,00 %), 108 (8,53 %), 121 (12,72 %), 122 (1,80 %), 149 (7,11 %), 150 (0 %), 164 (46,81 %), 165 (4,96 %), 166 (0 %)

Isotopenverhältnisse Selen

76 (9 %), 77 (7,6 %), 78 (23,5 %), 80 (50 %), 82 (9 %)

Molekülionencluster von Dimethyldiselenid (**Abb. 5-5**) :

m/z 182 (0,8 %), 183 (1,4 %), 184 (4,8 %), 185 (3,6 %), 186 (14,5 %), 187 (7,6 %), 188 (25,2 %), 189 (1,4 %), 190 (29,2 %), 192 (9,0 %), 194 (0,8 %)

6 Literatur

- [1] KRINGS U, BERGER RG – Biotechnological production of flavours and fragrances, *Appl Microbiol Biotechnol* **49**, 1-8 (1998)
- [2] AROMEN-VERORDNUNG vom 22. Dezember 1981 (BGBl. I S. 1625, 1675), zuletzt geändert durch Art. 19 VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe vom 29.1.1998 (BGBl. I S. 230, 298)
- [3] BERGER RG – *Aroma Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin (1995)
- [4] VANEK Z, HOSTALEK Z – *Overproduction of Microbial Metabolites*, Butterworths, Boston (1986)
- [5] PRÄVE P, FAUST U, SITTIG W, SUKATSCH DA – *Handbuch der Biotechnologie*, R. Oldenbourg Verlag, München, 4. Aufl. (1994)
- [6] HERBERT R B – *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, London (1989)
- [7] UDEN PC – Element-Selective Gas Chromatographic Detection by Atomic Plasma Emission Spectroscopy, in: Sievers R E (ed.) - *Selective Detectors*, Chemical Analysis Series, Vol. 131, Wiley & Sons, New York (1995)
- [8] BANNIER A, DERUAZ D, WEBER C – Analysis of Caffeine Deutero Isotopomers by Gas Chromatography and Atomic Emission Detection, *HP Appl Note* 228-269 (1995)
- [9] DERUAZ D, BANNIER A, DESAGE M, BRAZIER JL - Elemental Analysis by Gas Chromatography-Atomic Emission Detection for the Control of a Deuterated Derivatization Reagent, *Anal Lett* **24**, 1531-1543 (1991)
- [10] DERUAZ D, SOUSSAN-MARCHAL F, JOSEPH I, DESAGE M, BANNIER A, BRAZIER JL – Analytical strategy by coupling headspace gas chromatography, atomic emission spectrometric detection and mass spectrometry – Application to sulfur compounds from garlic, *J Chromatogr A* **677**, 345-354 (1994)
- [11] DAVID F, SANDRA P – Capillary Gas Chromatography-Spectroscopic Techniques in Natural Product Analysis, *Phytochem Anal* **3**, 145-152 (1992)
- [12] BALOGA DW, REINECCIUS GA, MILLER JW – Characterization of Ham Flavor Using an Atomic Emission Detector, *J Agric Food Chem* **38**, 2021-2026 (1990)
- [13] LEIBRAND RJ, QUIMBY BD, FREE M – Use of multispectral analysis in the characterization of a perfume, *HP Appl Note* IRD 92-2 (1992)

-
- [14] GERBERSMANN C, LOBINSKI R, ADAMS FC – Determination of volatile sulfur compounds in water samples, beer and coffee with purge and trap gas chromatography-microwave-induced plasma atomic emission spectrometry, *Anal Chim Acta* **316**, 93-104 (1995)
- [15] STEGLICH W, FUGMANN B, LANG-FUGMANN S - Römpf Lexikon Naturstoffe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997)
- [16] LOMASCOLO A, STENTELAIRE C, ASTHER M, LESAGE-MEESSEN L – Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavors for the food industry, *Trends Biotechnol* **17**, 282-289 (1999)
- [17] PAGE GV, SCIRE B, FARBOOD MI – Preparation of natural methyl anthranilate with fungi, WO 8900203 A1 890112 (1989)
- [18] BERGER RG, NEUHAUSER K, DRAWERT F – Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms 6. Odorous constituents of *Polyporus durus*, *Z Naturforsch* **41c**, 963-970 (1986)
- [19] BERGER RG, DRAWERT F, HÄDRICH S – Microbial sources of flavour compounds. In: Schreier P (ed.) *Bioflavour 1987*, de Gruyter, Berlin (1987)
- [20] GROSS B, YONNET G, PICQUE D, BRUNERIE P, CORRIEU G, ASTHER M – Production of methylanthranilate by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* (Karst.), *Appl Microbiol Biotechnol* **34**, 387-391 (1990)
- [21] GILSON E, *Chem Zentralbl.* **1**, 722 (1903)
- [22] KRAMMER G, WINTERHALTER P, SCHWAB M, SCHREIER P – Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: Apricot (*P. armeniaca*, L.), Peach (*P. persica*, L.), Yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*), *J Agric Food Chem* **39**, 778-781 (1991)
- [23] RONG TANG, WEBSTER F X, MÜLLER-SCHWARZE D – Phenolic compounds from male castoreum of the north american beaver (*Castor canadensis*), *J Chem Ecol* **19**, 1491-1500 (1993)
- [24] NISHIDA R, IWAHASHI O, KENG HONG TAN – Accumulation of *Dendrobium superbum* (*Orchideae*) fragrance in the rectal glands by males of the melon fly (*Dacus cucurbitae*), *J Chem Ecol* **19**, 713-722 (1993)
- [25] AYER W A, SINGER P - Phenolic metabolites of the bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*, *Phytochem* **19**, 2717-2721 (1980)
- [26] BÖKER A - Untersuchungen zur biotechnischen Gewinnung einer Fruchtaroma-Impact-Verbindung mit Kulturen von Basidiomyceten, Diss Uni Hannover (1997)

-
- [27] WEBSTER C, COOKE M – Use of an Atomic Emission Detector to Study the Variation in Elemental Response for Chlorine, Carbon, and Oxygen in Phenols, *J High Resol Chromatogr* **18**, 319-322 (1995)
- [28] HUANG YIERU et al. – The Effect of Compound Structure on the Elemental Responses in Gas Chromatography-Microwave Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry, *J Chromatogr Sci*, **28**, 584-588 (1990)
- [29] BOS R, BARNETT N W – Some Observations on the Effect of Molecular Structure Upon the determination of the Selenium to Carbon Ratios in Various Organoselenium Compounds Using Gas Chromatography With Atomic Emission Spectrometri Detection, *J Anal Atom Spectrom* **12**, 733-741 (1997)
- [30] DE JONG E, FIELD JA, SPINNLER HE, WIJNBERG JBPA, DE BONT JAM – Significant Biogenesis of Chlorinated Aromatics by Fungi in Natural Environments, *Appl Environ Microbiol* **60**, 264-269 (1994)
- [31] TAUBERT J – Aromatische Metabolite in Zellkulturen von Basidiomyceten, Diss, Uni Hannover (2000) in Vorbereitung
- [32] DE JONG, FIELD JA, DINGS JAFM, WIJNBERG JBPA, DE BONT JAM – De novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55, *FEBS Lett* **305**, 220-224 (1992)
- [33] SCHLEGEL H G – Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Aufl. (1985)
- [34] MICHAL G – Biochemical Pathways, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1999)
- [35] EGGERT C – Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*, *Microbiol Res* **152**, 315-318 (1997)
- [36] EGGERT C, TEMP U, ERIKSSON K-E L – The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase, *Appl Environ Microbiol* **62**, 1151-1158 (1996)
- [37] GEHRKE M, Funktionalisierung von Polystyren-Divinylbenzen-Harzen zur selektiven Festphasenextraktion von Aromastoffen, Diss, Uni Hannover (2000)
- [38] KRINGS U, KELCH M, BERGER RG – Adsorbents for the Recovery of Aroma Compounds in Fermentation Processes, *J Chem Techn Biotechnol* **58**, 293-299 (1993)
- [39] BERGER RG – *Biotechnol Bioeng* **30**, 987-990 (1987)

-
- [40] GLOGE A, LANGER B, POPPE L, RÉTEY J – The Behavior of Substrate Analogues and Secondary Deuterium Isotope Effects in the Phenylalanine Ammonia-Lyase Reaction, *Arch Biochem Biophys* **359**, 1-7 (1998)
- [41] RÖMER A, HERBERT R B – Further Observations on the Source of Nitrogen in Phenazine Biosynthesis, *Z Naturforsch* **37c**, 1070-1074 (1982)
- [42] BUDZIKIEWICZ H, DJERASSI C, WILLIAMS D H – Mass Spectrometry of Organic Compounds, Holden-Day, Inc., San Francisco (1967)
- [43] SPITELLER G – Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen – Eine Einführung, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1966)
- [44] KARLSON P – Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 13. Aufl., (1988)
- [45] JENNINGS W, SHIBAMOTO T – Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography, Academic Press, New York (1980)
- [46] KONDOJOYAN N, BERDAGUÉ JL – A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds, Edition du Laboratoire Flaveur (1996)
- [47] NAMBUDIRI AMD, VANCE CP, TOWERS GHN – Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*, *Biochem J* **134**, 891-897 (1973)
- [48] TOWERS GHN – Secondary Metabolites Derived Through the Shikimate-Chorismate Pathway, in: SMITH JE, BERRY DR (eds.) – The Filamentous Fungi Vol II Biosynthesis and Metabolism, Arnold, London (1976)
- [49] ANKE T, persönliche Mitteilung (1999)
- [50] MILES P G, CHANG S T- Fruiting of *Lentinus edodes* (Shiitake) in liquid media, *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol* **3**, 103-112 (1987)
- [51] SPAETHER S – Zellkulturen von Shiitake – Schwefelmetablismus und Lentinsäurebildung im Speisepilz *Lentinus edodes*, Diss, Uni Hannover (2000) in Vorbereitung
- [52] SOUCI, FACHMANN, KRAUT - Die Zusammensetzung der Lebensmittel – Nährwerttabellen, medpharm CRC Press (1994)
- [53] CAI X-J, UDEN P C, BLOCK E, ZHANG X, QUIMBY B D, SULLIVAN J J – *Allium Chemistry*. Identification of Natural Abundance Organoselenium Volatiles from Garlic, Elephant Garlic, Onion and Chinese Chive Using Headspace Gas Chromatography with Atomic Emission Detection, *J Agric Food Chem* **42**, 2081-2084 (1994)

-
- [54] LIU Y, LOPEZ-AVILA V, ALCARAZ M, BECKERT WF – Simultaneous Determination of Organotin, Organolead, and Organomercury Compounds in Environmental Samples Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection, *J High Resol Chromatogr* **17**, 527-536 (1994)
- [55] COOK J, ENGEL M, W P, QUIMBY B – Multiresidue Screening of Pesticides in Foods Using Retention Time Locking, GC-AED, Database Search, and GC-MS Identification, *J AOAC Intern* **82**, 313-326 (1999)
- [56] BECKER G, NILSSON U, COLMSJÖ A, ÖSTMAN C – Determination of polycyclic aromatic heterocyclic compounds in airborne particulate by gas Chromatography with atomic emission and mass spectrometric detection, *J Chromatogr A* **826**, 57-66 (1998)
- [57] PEDERSEN-BJERGAARD S, SEMB SI, BREVIK EM, GREIBROKK T – Capillary gas chromatography combined with atomic emission detection for the analysis of polychlorinated biphenyls, *J Chromatogr A* **723**, 337-347 (1996)
- [58] LINKERHÄGNER M, STAN HJ – Screening analysis of pesticide residues in plant foodstuffs by capillary gas chromatography using the DFG multiresidue method S19: a comparison of customary detection by ECD/NPD with the novel atomic emission detector (AED), *Z Lebensm Unters Forsch* **198**, 473-479 (1994)
- [59] SULLIVAN JJ, QUIMBY BD – Characterization of a Computerized Photodiode Array Spectrometer for Gas Chromatography-Atomic Emission Spectrometry, *Anal Chem* **62**, 1034-1043 (1990)
- [60] GOTTWALD W – GC für Anwender, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1995)
- [61] KITTLESON JR, PANTALEONE DP – Process for the synthesis natural aromatics, US Patent US005437991 A (1995)
- [62] Produktkatalog, Difco Laboratories GmbH, Augsburg (1996/97)
- [63] Peptone und sonstige Nährbödenzusätze, bioMérieux, Nürtingen (1998)
- [64] ABRAHAM B, ONKEN J, REIL G, BERGER RG – Strategies toward an efficient biotechnology of aromas, in: KRUSE HP, ROTHE M (eds.) - Flavour Perception Aroma Evaluation, Proc. of the 5th Wartburg Aroma Symposium, Eigenverlag Universität Potsdam (1997)
- [65] ANKE T (ed.) – Fungal Biotechnology, Chapman & Hall, Weinheim (1997)
- [66] ARAMAYO R, TIMBERLAKE W E – Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase I) gene, *Nucleic Acids Res* **18**, 3415 (1990)
- [67] KUNZE U R – Grundlagen der quantitativen Analyse, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1990)

-
- [68] BRENDA The Enzyme Database, D. Schomburg, Inst. f. Biochemie, Uni Köln, <http://srs.ebi.ac.uk>
- [69] MIYAGAWA E, YANO J, HAMAKADO T, KIDO Y, NISHIMOTO K, MOTOKI Y – Crystallization and Properties of N-Benzoylglycine Amidohydrolase from *Pseudomonas putida*, *Agric Biol Chem* **49**, 2881-2886 (1985)
- [70] HELDT HW – Pflanzenbiochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)
- [71] HRAZDINA G, KREUZALER F, HAHLBROCK K, GRISEBACH H – Substrate specificity of flavanone synthase from cell suspension cultures of parsley and structure of release products *in vitro*, *Arch Biochem Biophys* **175**, 392-399 (1976)
- [72] SCHÜZ R, HELLER W, HAHLBROCK K – Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*, *J Biol Chem* **258**, 7730-6734 (1983)
- [73] BOREJSZA-WYSOCKI W, HRAZDINA G – Biosynthesis of p-Hydroxyphenylbutan-2-one in raspberry fruits and tissue cultures, *Phytochem* **35**, 623-628 (1994)
- [74] BOREJSZA-WYSOCKI W, HRAZDINA G – Aromatic polyketide synthases: Purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits, *Plant Physiol* **110**, 791-799 (1996)
- [75] HOPWOOD DA, SHERMAN DH – Molecular Genetics of Polyketides and its Comparison to Fatty Acid Biosynthesis, *Annu Rev Genet* **24**, 37-63 (1990)
- [76] NUMA S (ed.) – New Comprehensive Biochemistry Vol. 7: Fatty Acid Metabolism and Its Regulation, Elsevier, Amsterdam (1984)
- [77] HOPWOOD DA - Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases, *Chem Rev* **97**, 2465-2497 (1997)
- [78] HUTCHINSON CR, FUJII I – Polyketide Synthase Gene Manipulation: A Structure-Function Approach in Engineering Novel Antibiotics, *Annu Rev Microbiol* **49**, 201-238 (1995)
- [79] O'HAGAN D – The Polyketide Metabolites, Ellis Horwood Ltd., London (1991)
- [80] HELLER W, FORKMANN G – Biosynthesis of flavonoids, in: HARBORNE JB (ed.) - The Flavonoids: Advances in research since 1986, Capman & Hall, London (1993)
- [81] NUHN P – Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe, S Hirzel Verlag, Stuttgart (1997)
- [82] ZOLLNER H – Handbook of Enzyme Inhibitors - Part A, Wiley-VCH, Weinheim 3rd ed. (1999)

-
- [83] WERKHOFF P, GÜNTERT M, KRAMMER G, SOMMER H, KAULEN J – Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits, *J Agric Food Chem* **46**, 1076-1093 (1998)
- [84] SCHREIER P, MOSANDL A – Aromaforschung heute, *Chemie in unserer Zeit* **19**, 22-31 (1985)
- [85] FALBE J, REGITZ M (eds.) *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- [86] LÄUCHLI A – Selenium in Plants: Uptake, Functions, and Environmental Toxicity, *Bot Acta* **106**, 455-468 (1993)
- [87] SIMON K – Selenmangel als Krankheitsursache, *Naturwiss Rundsch* **38**, 108 (1985)
- [88] FISHBEIN L – Perspectives on Selenium Anticarcinogenicity, *Toxicol Environ Chem* **12**, 1-30 (1986)
- [89] WU L, GUO X, BANUELOS GS – Accumulation of Seleno-amino acids in legume and grass plant species grown in Selenium-laden soils, *Environ Toxicol Chem* **16**, 491-497 (1997)
- [90] CAI X-J, BLOCK E, UDEN P C, ZHANG X, QUIMBY B D, SULLIVAN J J – *Allium* Chemistry: Identification of Selenoamino Acids in Ordinary and Selenium-Enriched Garlic, Onion, and Broccoli Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection, *J Agric Food Chem* **43**, 1754-1757 (1995)
- [91] BELITZ HD, GROSCH W – *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag, Heidelberg, 4. Aufl. (1992)
- [92] Aldrich Produktkatalog (2000)
- [93] FLEET-STALDER V VAN, GÜRLÜK H, BACHOFEN R, CHASTEEN T G - Effects of growth conditions on production of methyl selenides in cultures of *Rhodobacter sphaeroides*, *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**, 98-103 (1997)
- [94] CHASTEEN TG – Confusion between dimethylselenyl sulfide and dimethyl selenone released by bacteria, *Appl Organomet Chem* **7**, 335-342 (1993)
- [95] CHASTEEN TG, SILVER GM, BIRKS JW, FALL R – Fluorine-Induced Chemiluminescence Detection of Biologically Methylated Tellurium, Selenium, and Sulfur Compounds, *Chromatographia* **30**, 181-185 (1990)
- [96] HALDIMANN M, BAJO C, HALLER T, VENNER T, ZIMMERLI B – Vorkommen von Arsen, Blei, Cadmium, Quecksilber und Selen in Zuchtpilzen, *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* **86**, 463-484 (1995)

-
- [97] TNO NUTRITION AND FOOD RESEARCH INSTITUTE - Volatile Compounds in Food, AJ Zeist, Niederlande, 7th ed. (1996)
- [98] MUSORIN G K, AMOSOVA S V, KOVALEVA T V – Reaction of diallyl selenide with thiols, *Zh Org Khim* **29**, 1493-1494 (1993)
- [99] BERTELSEN F, GISSEL-NIELSEN G, KJAER A, SKRYDSTRUP T – Selenoglucosinolates in nature: fact or myth?, *Phytochem* **27**, 3743-3749 (1988)
- [100] LIST OF CULTURES, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, Niederlande, 33rd Edition (1994)
- [101] CATALOGUE OF FILAMENTOUS FUNGI, American Type Culture Collection, Rockville, USA, 18th Edition (1991)
- [102] SPRECHER E - Über die Guttation bei Pilzen, *Planta* **53**, 565-574 (1959)
- [103] WALKER M A, ROBERTS D R, DUMBROFF E C – Convenient apparatus for methylating small samples with diazomethane, *J Chromatogr* **241**, 390-391 (1982)
- [104] BLAU K, KING G S - Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden & Son Ltd., London, U. K. (1978)
- [105] ROUGHLEY PJ, WHITING DA – Experiments in the biosynthesis of curcumin, *J Chem Soc Perkin Trans* **1**, 2379-2387 (1973)
- [106] GATTERMANN L, WIELAND H – Die Praxis des organischen Chemikers, Walter de Gruyter, Berlin, 43. Aufl. (1982)
- [107] MILSTIEN S, KAUFMANN S – Studies on the Phenylalanine Hydroxylase System *in Vivo*, *J Biol Chem* **250**, 4782-4785 (1975)
- [108] GALATSIS P, MANWELL JJ, BLACKWELL JM – Indenone synthesis. Improved synthetic protocol and effect of substitution on the intramolecular Friedel-Crafts acylation, *Can J Chem* **72**, 1656-1659 (1994)

Lebenslauf

Manuela Fischer
geboren am 29.09.1971 in Eschwege

Schulische Ausbildung

Sept. 1977 - Juli 1981	Mittelpunktschule Wehretal (Grundschule)
Aug. 1981 - Juli 1987	Friedrich-Wilhelm-Schule, Eschwege (Gymnasium)
Aug. 1987 - Juli 1990	Oberstufengymnasium, Eschwege - Abschluss: Allg. Hochschulreife

Akademische Ausbildung

Okt. 1990 - Mai 1995	Studium der Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität/GH Wuppertal - Abschluss: Erstes Staatsexamen
Juni 1995 - Mai 1996	Praktisches Jahr, Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster - Abschluss: Zweites Staatsexamen
Febr. 1997	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover (Prof. Dr. R. G. Berger)
